

**Grundlagenstudien zum Problem der  
Thrombozytenkonservierung unter  
besonderer Berücksichtigung des  
Thrombozyten - Metamorphogramms**

**Willi Appel**

1962



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41555208\\_0072](https://archive.org/details/IA41555208_0072)



**Grundlagenstudien zum Problem der  
Thrombozytenkonservierung unter  
besonderer Berücksichtigung des  
Thrombozyten - Metamorphogramms**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Willi Appel**

aus Mackenbach/Kaiserslautern

München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Referent: Prof. Dr. R. MARX

Correferent: Prof. Dr. H. SCHWIEGK

Dekan: Prof. Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Mai 1962



vorgelegt von

WILLI APPEL

aus Malsbacht/Kaiserslautern

München 1962

A. INHALT

B. INHALT

C. INHALT

Einleitung des Verfassers zur ersten Auflage  
 Einleitung des Verfassers zur zweiten Auflage

- II. Einfluss des Lebensalters auf die Entwicklung  
 des  
 Kindes  
 Parallelen  
 Zusammenfassung

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT GEWIDMET

- III. Verhalten von Tieren  
 Kämpfe  
 Menschenleben  
 Kind  
 Zucht  
 Hund  
 Schwein  
 Huhn  
 Ferkel  
 Ferkel  
 Ferkel

IV. Verhalten von Tieren

- V. Verhalten von Tieren  
 a) Verhalten  
 b) Verhalten  
 c) Verhalten  
 d) Verhalten  
 e) Verhalten



# INHALTSÜBERSICHT

## A. EINLEITUNG

## B. METHODIK

## C. ERGEBNIS

- I. Einfluss von Temperaturschwankungen auf die Gestalt von Thrombozyten im Citratplasma
- II. Einfluss des Zentrifugierens auf Thrombozyten
  - Glas
  - Silicon
  - Paraffin
  - Kunststoffe
- III. Verhalten von Tierthrombozyten
  - Kaninchen
  - Meeschweinchen
  - Rind
  - Schaf
  - Pferd
  - Schwein
  - Huhn
  - Hund
  - Ratte
  - Frosch
  - Hummer
- IV. Verhalten von konservierten Thrombozyten
- V. Verhalten von Thrombozyten thrombozytopathischen Blutes
  - a) Lebererkrankungen
  - b) Leukämien
  - c) Osteomyelosklerose
  - d) Thrombocythämien
  - e) Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli



## A. EINLEITUNG

Die erste Beschreibung der Thrombozyten geht auf DONNÉ (1842), sowie auf ZIMMERMANN (1847), OSLER (1874) und HAYEM (1878) zurück. Der eigentliche Begründer der Plättchenmorphologie und -funktion ist jedoch BIZZAZZO (1882), der eine morphologische Beschreibung der Thrombozyten gab, auf ihre Tendenz, an geschädigten Endothelpartien haften zu bleiben, hinwies, sowie ihren Zerfall im Verlauf der Gerinnung beschrieb. Nach ihm untersuchten DEETJEN, ROSIN, BIBERGEIL die "Bewegungsfähigkeit" der Thrombozyten und vor allem FONIO und Mitarbeiter (1942) konnten im Dunkelfeld Pseudopodienbildung ausnehmen. Sie unterschieden klar zwischen Granulomer und Hyalomer. Diese Studien wurden im Phasenkontrastmikroskop und insbesondere im Elektronenmikroskop von R. MARX und Mitarbeitern fortgesetzt und führten zur Ausarbeitung einer Methode, mit der zwei Grundeigenschaften der Thrombozyten - Evolution und Adhäsion - qualitativ und quantitativ erfasst werden konnten (H. KREITER). Damit wurde erstmals das Thrombozyten-Metamorphogramm (R. MARX) aufgestellt.

Aufgabe vorliegender Arbeit war es, eine Methode auszuarbeiten, mit Hilfe deren es möglich ist, Thrombozyten über längere Zeit (mehr als 3 Wochen) in der Kühltruhe (-20°C) zu konservieren, ohne die Thrombozytenfunktion grob zu schädigen.

Zunächst werden die Voraussetzungen zur Thrombozyten-Konservierung untersucht:

1. Nicht benetzbare Oberflächen;
2. möglichst geringe Traumatisierung in thermischer und mechanischer Hinsicht;
3. Befreiung von Plasmabestandteilen;
4. geeignetes Anticoagulum;
5. Versuchstier zur Thrombozytenprüfung in vivo.

Im letzten Abschnitt der Arbeit werden die Funktionsmorphologie der Thrombozyten von thrombozytopathischem Blut dargestellt und therapeutische Möglichkeiten - insbesondere bei Thrombasthenie Glanzmann- Naegeli - diskutiert.

## B. METHODIK

Im Mittelpunkt unserer Thrombozytenfunktionsprüfungen stand das Thrombozyten-Metamorphogramm (TMG), das von K. KÖHL ausgearbeitet und von H. KREITER und H. J. IBROM modifiziert wurde. Die Ergebnisse nachfolgender Untersuchungen erlauben deshalb einen Vergleich mit denen, die oben genannte Untersuchungen erzielten.

In einer Übersicht wird zunächst die Arbeitsweise kurz dargelegt. Daran schliesst sich eine genaue Beschreibung der einzelnen Phasen des üblichen Versuchsganges an.

## Übersicht

Einer gesunden Versuchsperson (Autor) wurden durch Punktion der Cubitalvene mittels 2 ccm Record-Spritze (V2A-Nadel Gr.1), der jeweils Na.citr. oder Sequestren als Anticoagulans vorgelegt war, 2 ccm Blut entnommen. Nach ausreichender Durchmischung wurde ein Tropfen Blut an den Rand des Deckglases einer Neubauer-Zählkammer gebracht und dann in üblicher Weise die Kammer, die mit Zaponlack überzogen war, beschickt. Nach 60 Minuten Sedimentation in feuchter Kammer wurden in einer Spülflüssigkeit alle Bestandteile, die nicht an der Folie hafteten, abgespült. Danach folgte eine Fixierung des Präparates in verdampfender Osmiumsäure, Abspülen der entstandenen Kristalle und Differenzierung im Lichtmikroskop bei Phasenkontrasteinstellung.

### a) Einzelheiten des Versuchsganges

#### I. Präparierung der Objektträger

Die Neubauer-Zählkammern überzogen wir mit Zaponlack (2 %ige Lösung von Collodium in Amylacetat mit 5 % abs. Alkohol) und erhielten so eine genormte Beschaffenheit der Oberfläche. Zunächst wurde die Zählkammer mittels eines mit Äther angefeuchteten Lappens sorgfältig von Staub und dergleichen gesäubert, mit einem Perlontuch nachpoliert und dann mit einem staubfreien Glasstab ein Tropfen Zaponlack auf die Mittelnute der Kammer aufgetragen. Durch leichtes Kippen der Kammer breitete sich der Lack gleichmässig über die Fläche aus. Die Zaponlack-schicht wählten wir möglichst dünn, weswegen die Kammer mehrmals über beide Längsseiten auf ein saugfähiges Filtrierpapier abgekippt und so überflüssiger Lack abgesaugt wurde. Die so präparierten Kammern wurden in staubfreien Petrischalen 12-20 Stunden zum Trocknen aufbewahrt. Länger trocknende Folien behielten ihre Eigenschaften, veränderten die Ergebnisse nicht und hatten eine erwünschte stärkere Widerstandskraft gegen mechanische Einflüsse.

#### II. Entnehmen des Blutes und Beschickung der Kammer

Interessiert hat die Funktionsmorphologie vor allem des Einzelthrombozyten -im geronnenen Blut sitzen die Thrombozyten in Haufen auf- und nebeneinander, so dass eine Differenzierung nicht möglich ist-, deshalb mussten wir die Wirkung eines gerinnungshemmenden Agens auf die Thrombozytenevolution (= Belastungsevolution) hinnehmen.

Als gerinnungshemmendes Mittel wurde 3,8 %iges Na-citrat bzw. 200 mg%iges Sequestren bzw. 20 mg%iges Hirudin verwendet. Unter Vorlage von 0,4 ccm Anticoagulans wurde mit einer 2 ccm-Record-Spritze (Kanüle

aus V2A-Stahl, Grösse 1) die V. cubitalis media punktiert und Blut ad 2,0 ccm aufgezogen. Nach Abnahme des Blutes wurde der Spritzenstempel bis zum Anschlag angezogen und durch leichtes Kippen der Spritze Anticoagulans und Blut ca. 2 Minuten durchmischt.

Aus der Spritze wurde dann die Kammer in üblicher Weise beschickt. Wir verwendeten hierbei niemals die ersten Tropfen, da das aus dem Spritzenansatz stammende Blut häufig angeronnen war und zu erwarten stand, dass es mit dem Anticoagulans nicht ausreichend in Berührung gekommen war.

Nach Beschickung von meist 2-3 Objektträgern wurden diese in feuchten Kammern 60 Minuten aufbewahrt.

### III. Spülen der Präparate

Nach 60 Minuten (R. KREITER hatte beobachtet, dass die Thrombozytenevolution nach dieser Zeit im wesentlichen abgeschlossen ist) wurde das Deckglas vorsichtig abgeschoben, die Kammer alsdann mit der Schichtseite nach unten in einen Objekthalter (= selbstgefertigtes Drahtgestell) eingelegt und sofort in die Spülflüssigkeit getaucht. Als solche wurde phys. NaCl-Lösung verwendet, die das gerinnungshemmende Agens in gleicher Konzentration enthielt wie das zu untersuchende Blut. Hierin verblieb die Kammer 5 Minuten und wurde dabei nicht bewegt. -

Pro Präparat genügten 50-100 ccm Spülflüssigkeit. - Danach wurde das Präparat vorsichtig aus der Spülflüssigkeit herausgenommen, das Drahtgestell entfernt und die Kammer etwas abgetropft.

### IV. Fixierung des Präparates

Zur Fixierung der auf der Folie haftenden Thrombozyten wurde Osmiumsäurelösung (2 %ig) verwendet, von welcher 2-3 Tropfen in eine kleine Petri-Schale gegeben wurden, die in einer feuchten Kammer stand. Die Präparate wurden aufrecht, mit der Schichtseite nach aussen, in die feuchte Kammer gestellt; nach 4 Minuten waren die Thrombozyten durch den sich entwickelnden Osmiumsäuredampf ausreichend fixiert.

Durch die in der Spülflüssigkeit enthaltenen Salze schlugen sich während des Fixierungsprozesses Kristalle auf der Folie nieder, die durch Schwenken der Präparate in aqua dest. leicht abgespült werden konnten.

Nach der sich jetzt anschliessenden Lufttrocknung standen die Präparate zur Begutachtung bereit.

### V. Differenzierung im Mikroskop

Eine Auswertung der Präparate wurde im Lichtmikroskop bei Phasenkontrasteinstellung mit Objektiv Pv 40x und Okular 12,5x vorgenommen.

Die auf der Folie klebenden Thrombozyten -manchmal klebten auch vereinzelt Erythrocyten und Leukos daran- zeigten verschiedene Ausbreitungsformen, die wir in 4 Stadien einteilen:

### 1. Stadium (Rundform)

Runde, manchmal ovale, glattrandige, undurchstrahlbare Scheibchen (leuchten in Phasenkontrasteinstellung hell auf), die im Lichtmikroskop keine Pseudopodien aufweisen. Sie entsprechen also bei der Beurteilung in Phasenkontrasteinstellung der intravasalen Zirkulationsform.

### 2. Stadium (Pseudopodienform)

Die Plättchen sind noch undurchstrahlbar, weisen aber deutliche Pseudopodien auf, die in Zahl, Anordnung und Verzweigungsart ein wechselndes Bild bieten.

### 3. Stadium (beginnende Ausbreitungsform)

Meist an der Wurzel oder zwischen zwei Pseudopodien beginnt die Ausbreitung des Plasmas. Die peripheren Teile des Thrombozyten sind nun durchstrahlbar (erscheinen in der Phasenkontrasteinstellung grau), während das Zentrum noch dicht und undurchstrahlbar sein kann.

### 4. Stadium (Endausbreitung)

Der in allen Teilen durchstrahlbare Thrombozyt ist weit ausgebreitet; Differenzierung in Granulomer und Hyalomer ist deutlich.

Ausdifferenziert wurden immer mindestens 4 der mittleren kleinen Quadrate der Neubauer-Zählkammer; die Beurteilung des TMG erfolgte in jedem Fall nach dem anteilmässigen Verhalten von Stadium 4, weil wir erst dieses Stadium als vollständige Ausbreitungsform und somit Vollfunktionsform betrachten.

Nach diesen methodologischen Darlegungen bez. TMG obliegt es uns, darauf hinzuweisen, dass die Evolution ein biologisches Phänomen ist, das sich als solches nicht immer mit naturwissenschaftlicher Akribie katalogisieren lässt, weswegen die verschiedenen Beobachter divergieren in der Beurteilung der Stadien III und IV insbesondere im Hinblick auf jene Ausbreitungsformen, die man als "Übergangsformen" (zwischen III und IV) betrachten muss. In vorliegender Arbeit wurden nur jene Thrombozyten als Stadium IV bezeichnet, die in allen Teilen durchstrahlbar und weit ausgebreitet waren und immer eine Differenzierung in Granulomer und Hyalomer eindeutig möglich war. Alle sogenannten Übergangsformen zwischen III und IV wurden zum Stadium III gezählt.

Dieser oben dargelegte Versuchsgang wurde bei Zimmertemperatur (20-22°C) durchgeführt. Im Folgenden wird die Arbeitsweise bei Versuchen unter anderen Temperaturen dargestellt.

## b) Besonderheiten des Versuchsganges

### 1. Versuche bei 37°C

Voraussetzung für eine exakte Aussage über das Verhalten von Thrombozyten bei einer Temperatur von 37°C war, dass während des gesamten Versuchsganges eine Temperaturkonstanz von 37°C aufrechterhalten wurde. Zu diesem Zwecke wurden Kanüle und Spritze mit vorgelegter gerinnungshemmender Substanz auf 37°C erwärmt. Nach Punktion der Armvene wurde die Spritze in den unter einer Temperatur von 37°C stehenden Brutschrank gebracht, dort erst der Spritzenstempel angezogen und das Blut mit vorgelegter Hemmsubstanz vermischt.

Die zu beschickenden Kammern waren ebenfalls im Brutschrank auf 37°C erwärmt, ebenso Spülflüssigkeit, feuchte Kammer und Fixierkammer. Am Arbeitsplatz wurde durch eine Lampe eine Lufttemperatur von ca. 37°C geschaffen und so das Deckglas abgeschoben, ohne dass eine Abkühlung statthaben konnte.

### 2. Versuche bei 0°C

Wir mussten eine Temperaturkonstanz von 0°C einhalten und brachten -analog dem unter 1. Dargelegten- Spritze, Zählkammer, feuchte Kammer, Spülflüssigkeit und Fixierkammer im Eisschrank auf die erforderliche Temperatur. Der Versuchsgang entsprach im übrigen dem oben beschriebenen.

## VI. Thrombozytenzählung

Die Anzahl der Thrombozyten pro cmm Blut bestimmten wir nach der Methode Feissly-Lüdin-Rovatti, Modifikation Derlath:

In eine Leukopipette wird gerinnungsgehemmtes Blut bis Marke 0,5 aufgezogen. Bis Marke 11 wird eine 2%ige Novocainlösung nachgezogen, durchmischt und 5 Minuten im Schüttler (Micro-Mix, Fa. Albert Dargatz, Hamburg I) belassen. Danach waren die Erythrozyten zum grossen Teil hämolysiert. Nun wird die Neubauer-Zählkammer mit dem Gemisch beschickt und 15-20 Minuten in feuchter Kammer -zur Vermeidung der Austrocknung des Präparates- der Sedimentierung überlassen. Anschliessend werden fünf der mittleren kleinen Quadrate ausgezählt und die Summe -sofern ein Mischungsverhältnis 1 : 5 vorlag- mit 1200 multipliziert; dieser Wert ergab die Thrombozytenzahl pro cmm.

## VII. Silikonisierung

An silikonisierten Oberflächen kleben die Thrombozyten nicht in dem Masse wie an unbehandeltem Glas (R. MARX, S. DERLATH). Ausserdem vermieden wir mit der Silikonisierung den innigen Kontakt der Thrombozyten mit Glas, das durch Alkaliabspaltung (= pH-Änderung) und Adsorption Thrombozytenstörungen verursachen kann.

Nachdem Glasspritzen, Kanülen, Zentrifugen und Reagenzgläser sili-

konisiert waren, konnten die Thrombozyten, bis ihre Evolution beurteilt wurde, nur mit silikonisierten Oberflächen in Berührung kommen. Der Silikonüberzug wurde vor jedem Gebrauch erneuert.

#### a) Silikonisierung der Glasspritzen und Reagenzgläser

In eine Flüssigkeit aus 4 Teilen Chloroform und 1 Teil Silikon (Dri-Film, SC-87, amerikanisches Fabrikat) wurden die gereinigten und getrockneten Glaswaren eingetaucht, danach in aqua dest. kurz gespült und zum Abtropfen aufgestellt. Bei 80°C wurde der Film eine Stunde lang aufgetrocknet; anschliessend erfolgte die Sterilisation bei 120°C.

#### b) Silikonisierung der Kanülen

Eine Flüssigkeit aus 0,5 Teilen eines für Metallwaren geeigneten Silikons (Monocote, amerik. Fabrikat) plus 99,5 Teilen aqua dest. wurde zum Kochen gebracht, dann die Kanülen hineingegeben und 3 Minuten lang mitgekocht. Waren dann die Kanülen bei 100°C völlig getrocknet, schloss sich die Sterilisation mit höherer Temperatur an.

### VIII. Paraffinierung

Ausser silikonisierten Oberflächen prüften wir paraffinierte und überzogen zu diesem Zweck Glasspritzen, Zentrifugengläser, Reagenzgläser und Messzylinder mit Paraffin (Eintauchen in flüssiges Paraffin), so dass die Thrombozyten nach Extravasation nur mit paraffinierten Oberflächen in Kontakt kamen. Aus technischen Gründen waren Kanüle und Glasspritze meist silikonisiert.

### IX. Waschen

Ausgehend von der Möglichkeit, dass eine Trennung der Thrombozyten vom Plasma ihre Lebensdauer erhöht (TULLIS), erstrebten wir einen maximalen Wascheffekt:

Auf 50 ccm physiologische NaCl-Lösung -im paraffinierten oder Kunststoff-zentrifugenglas- gaben wir 1 ccm thrombozytenreiches Plasma. Bei 16.000 U/Min zentrifugierten wir die Thrombozyten 4 Minuten aus der Waschflüssigkeit ab; die überstehende Waschflüssigkeit wurde abgehoben und die Thrombozyten in einem besonderen Medium zur Konservierung in die Tiefgefriertruhe gebracht. (Die Nachteile einer Mehrfachwaschung, wie sie beim Biggstest angewandt wird, glaubten wir so umgehen zu können).

### X. Zentrifugieren

In paraffinierten Polyäthylen-Zentrifugengläsern wurden die Thrombozyten bei 16.000 U/Min 4 Minuten lang zentrifugiert (Zentrifuge: Fa. Christ, Mainz). Zur Vermeidung von Wärmeeffekten, wie sie bei nicht gekühlten Zentrifugen auftreten, haben wir mit der Kühlanlage eine Temperatur von 20°C aufrecht erhalten. Die hohe Agglutinationsneigung der Thrombozyten untereinander, die wir als Folge des Zentrifugierens beob-

achteten, konnten wir durch Verwendung von 200 mg% Di-Na-Sequestern (1 ad 10) als Anticoagulans vermeiden.

XI. a) Konservierungsmedium =

- 5 cm<sup>3</sup> Glycerin (15 ‰ig)
- 10 mg Glucose (100 mg%)
- 2 mg Inosin oder Adenosin (20 mg%)
- 0,3 mg Reverin (3 mg%)
- 1 cm<sup>3</sup> Sequestren (20 mg pro 1 cm<sup>3</sup> aqua dest. = 200 mg%)
- 4 cm<sup>3</sup> Gelatine (5 cm<sup>3</sup> ad 100 cm<sup>3</sup> phys. NaCl = 2,0 g%)

Durch mehrmäliges Zentrifugieren der verflüssigten Gelatine und anschliessendes Abhebern des Überstands, befreiten wir die Gelatine von Verunreinigungen. Darin wurden Thrombozyten von 5-10 cm<sup>3</sup> Plasma aufgenommen.

b) Anticoagulans

("Titriplex" III, E. Merck, Darmstadt = Äthylendiaminotetraessigsäure C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O Mol. Gewicht 372,25)

Di-Na-Sequestren schien uns nach den Ergebnissen von K.H. KÖHL und H. KREITER als das geeignetste Anticoagulans zur Thrombozytenkonservierung, weil die Thrombozyten unter seinem Einfluss ihre Fähigkeit zu kleben fast völlig verlieren und die Evolution besonders stark gehemmt ist. Wir verwenden es in einer Konzentration von 200 mg% sowohl als Vorlage bei der Punktion der Cubitalvene, als auch als Zusatz zur Konservierungslösung. Dadurch gelang es, die Thrombozyten -wegen der herabgesetzten Agglutination untereinander- in der Konservierungslösung leichter zu suspendieren.

Wir prüften ferner Hirudin (Reinsubstanz des Pharmakologischen Instituts) als Anticoagulans, konnten aber bei einer Konzentration bis zu 20 mg% keine wesentliche Hemmung der Evolution beobachten, wohl aber eine Herabsetzung der Adhäsion, gemessen im Adhäsionmeter (nach R. MARX). Bei einem Winkel von 22,5° und einer Temperatur von 37°C fanden wir folgende Werte:

| Konzentration | Adhäsion |
|---------------|----------|
| 5 mg%         | 32 %     |
| 10 mg%        | 23 %     |
| 20 mg%        | 12 %     |

gegenüber 55-60 % im Citratblut. Die unter dem Einfluss der bislang geprüften Anticoagulantien beobachtete Agglomeration der Thrombozyten im Adhäsionmeter blieb unter Hirudineinfluss aus.

## XII. Abfüllung und Lagerung der Thrombozytenkonzentrate

Die aus der Waschlösung abzentrifugierten Thrombozyten haben wir nach vorheriger TMG-Prüfung in der Konservierungslösung aufgeschüttelt. (Thrombozyten aus 4 ccm Plasma in 10 ccm Konservierungsmittel.) Meist belassen wir die Thrombozyten in dem Zentrifugenglas und gaben die Konservierungslösung zu, zur Vermeidung von Thrombozytenverlusten.

Die Konservierungslösung wurde mit Paraffin-Öl überschichtet und die Reagenzgläser aufrecht stehend in der Kühltruhe bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## XIII. Vorbereitung der konservierten Thrombozyten zur Untersuchung

|                  |             |
|------------------|-------------|
| In Abständen von | 6 Stunden,  |
|                  | 12 Stunden, |
|                  | 1 Tag,      |
|                  | 2 Tagen,    |
|                  | 1 Woche,    |
|                  | 2 Wochen,   |
|                  | 3 Wochen,   |
|                  | 4 Wochen,   |
|                  | 6 Wochen,   |
|                  | 8 Wochen,   |
|                  | 12 Wochen,  |

wurde je eine Probe aus der Kühltruhe entnommen und stufenweise aufgetaut: 15 Minuten Kühlschrank ( $4^{\circ}\text{C}$ ), 15 Minuten Zimmertemperatur ( $20^{\circ}\text{C}$ ), 15 Minuten Brutschrank ( $37^{\circ}\text{C}$ ).

Die Thrombozyten haben wir wie folgt von der Konservierungslösung befreit:

1. Bei 1500 U/Min wurden die Thrombozyten 4 Minuten lang aus der Konservierungslösung abzentrifugiert.
2. Thrombozyten-Niederschlag wurde in 10 ccm physiologischer NaCl (pH 5, 6) suspendiert und dann erneut abzentrifugiert (1500 U/Min).
3. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt und anschliessend wurden die Thrombozyten drei Funktionsprüfungen unterzogen.

## XIV. Tierversuche

Unsere in-vitro-Versuche setzen die Thrombozyten unnatürlichen Bedingungen aus, so dass die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf das Verhalten der Thrombozyten in vivo schliessen lassen. Um dem Problem der Beobachtung der Thrombozyten-Evolution im Lebenden näher zu kommen, haben wir Tierthrombozyten mit der Methodik des TMG untersucht. (Einzelheiten des Versuchsganges werden zusammen mit den Ergebnissen dargestellt.)

## Automatische Registrierung von Gerinnungskurven mit dem Thrombelastographen (nach HARTERT)

In allen Fällen, in denen die Thrombusfestigkeit geprüft werden sollte, bedienen wir uns des Thrombelastographen.

Der von HARTERT entwickelte Thrombelastograph (Hellige, Freiburg) misst fortlaufend die Scherelastizität des in Bildung begriffenen, des vollendeten, wie des sich lösenden Thrombus *in vitro*; er ermöglicht die exakte Bestimmung der Gerinnungszeit, des Gerinnselaufbaues, der mechanischen Beanspruchbarkeit (Fibrinelastizität) und der Fibrinolyse sowohl am unveränderten Vollblut als auch am Plasma und zwar durch gleichzeitige visuelle und photokinematographische Registrierung des Gerinnselablaufs (Technik der Ausführung siehe Jürgens/Beller, Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse S.301 ff.).

Wir verwandten bei der Thrombelastographie mit Recalcifizierungstechnik Citratblut und pipettierten in die Stahlküvetten jeweils 0,3 ml Citratblut (1 Teil 3,8 %ige Na-citr.-Lösung + 4 Teile Blut) und recalcifizierten mit 0,06 ml einer 1,29 %igen CaCl-Lösung (Technik nach HARTERT). Bei pharmakologischen Zusätzen kamen 0,2 ml Citratblut + 0,1 ml des betreffenden Pharmakons zur Untersuchung, wobei ein Kontrollwert immer vorangestellt wurde.

### Auswertung

Am TEG werden registriert:

"Reaktionszeit" (r) = Zeit von der Recalcifizierung bis zur ersten nachweisbaren Viskositätszunahme, die sich auf dem Papierstreifen als Verbreiterung (um 1 mm) der anfangs ungeteilt als Linie verlaufenden Kurve anzeigt. Die "Thrombusbildungszeit" (k) = Zeit vom Beginn der eben nachweisbaren Elastizitätszunahme (Ende der Reaktionszeit) bis zu einer Verbreiterung der TEG-Kurve auf eine Amplitude (a) von 20 mm. Der in Millimetern gemessene Abstand entspricht -geteilt durch 2- dem Wert k in Minuten. K = Zeit von Beginn der eben nachweisbaren Elastizitätszunahme (= Ende der Reaktionszeit) bis zur maximalen Verbreiterung der TEG-Amplitude.

Die "maximale Thrombuselastizität" ( $m_E$ ) entspricht der Grösse der maximalen Fibrinelastizität, dem Viskositätsoptimum und ergibt sich aus der maximalen Amplitude (m) der TEG-Kurve. Die  $m_E$  Werte werden einer Tabelle entnommen, die nach der Formel  $E = \frac{100 \times m_a}{100 - m_a}$  errechnet werden.

## Normalwerte

|   |   |         |   |       |
|---|---|---------|---|-------|
| r | = | 12 Min. | ± | 3,5 % |
| k | = | 6 Min.  | ± | 10 %  |
| K | = | 33 Min. |   |       |
| m | = | 95-150  | ± | 2,5 % |

## Messung der Retraktion nach BENTHAUS

Die Teströhrchen haben die Grösse gewöhnlicher Reagenzgläser und waren in unserem Fall nicht graduirt. In eine 5 ccm-Record-Glasspritze wird bei Vorlage von 1 ccm 3,8 %iger Na-citr.-Lösung aus der Armvene entnommenes Blut bis zur Marke 5 aufgezogen. Das Citratblut wird 6 Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert, das überstehende Plasma abgehoben. Es reicht für 2 Retraktionsbestimmungen. Wenn es durch Beimengung von Erythrozyten noch etwas rötlich gefärbt ist, stört dies den Versuch nicht merklich.

Als Thrombokinase wird die eigener Herstellung (R.MARX) verwendet. Davon gibt man zwei Tropfen in das Teströhrchen. Dazu fügen wir 0,5 ccm einer 1 %igen  $\text{CaCl}_2$ -Lösung. Sodann 8,5 ccm physiologische NaCl-Lösung; zuletzt wird 1 ccm Citratplasma zugesetzt. Dieser Zeitpunkt wird markiert, da nunmehr die Gerinnung beginnt. Das Gemisch muss noch durch mehrfaches Kippen homogenisiert werden. Den Eintritt der Gerinnung erkennt man leicht an der im durchfallenden Licht gut sichtbaren Eintrübung des Plasmagemisches. Das Coagulum muss jetzt so von der Glaswand abgelöst werden, dass es zu keiner Deformierung kommt. Dazu wird das Glas in ein Tuch eingeschlagen und das Glas dann so gedreht, wie man zum Beispiel einen Kreisel in Bewegung setzt. Das Gerinnsel macht infolge seines Beharrungsvermögens die plötzliche Bewegung nicht mit und reisst von der Glaswand ab. Jetzt ist die Voraussetzung für eine ungehinderte Retraktion gegeben. Das Glas wird senkrecht stehend im Brutschrank aufgestellt. Man kann nun in jedem Augenblick die Gerinnsellänge mit einem Stechzirkel am Testglas abgreifen und in Skaleneinheiten angeben. Aus den Längenwerten lässt sich das Volumen berechnen, weil das Verhältnis von Länge zu Breite konstant ist.

Der prozentuale Anteil des Serums am ursprünglichen Ansatz von 10 ccm wird zum Massstab der Retraktion genommen. Wenn z.B. die gemessene Serummenge 7,5 ccm beträgt, so bezeichnen wir die Retraktion als 75 %ig. Ist die Retraktion kleiner als 90 %, so liegt eine Hemmung vor, die auf eine Insuffizienz der Thrombozyten verdächtig ist.

Bei zwei Fällen von Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli haben wir die Retraktion jeweils so gemessen, dass wir die Volumina halbiert haben (Abb. 16). Da wir nichtgraduierte Teströhrchen verwendet haben, geben wir die Gerinnsellänge in cm an.

Alle Thrombozytenfunktionsprüfungen beziehen sich auf 250.000 Thrombozyten pro cmm.

### Agglutinogrammverfahren nach B.ROVATTI

Um die Thrombozytenagglutination (= die Eigenschaft der Thrombozyten, untereinander festere, meist irreversible Verbindungen einzugehen) zu prüfen, bedienen wir uns der von B.ROVATTI angegebenen Methode:

Auf einem optimal gereinigten Objektträger wird mit Hilfe eines geschliffenen Deckgläschens ein gleichmässig dünner Ausstrich angefertigt. Der Blutropfen muss sofort nach Entnahme aus dem Ohrläppchen oder der Kanüle ausgestrichen werden. Das luftgetrocknete Präparat wird mit May-Grünwald-Giemsa-Lösung wie folgt gefärbt:

- 3 Min. May-Grünwald-Lösung
- 1 Min. mit aqua dest. überschichten,  
dann abgiessen
- 18 Min. reichlich Giemsa-Lösung,  
dann mit aqua dest gründlich spülen.

Um die Thrombozyten intensiver zu färben, empfiehlt es sich, die Giemsa-Lösung 30 Minuten auf dem Ausstrich zu belassen.

Das fertige Präparat wird mit Ölimmersion eingestellt und die Thrombozytenagglutination ausgezählt:

Es werden auf 100 einzeln liegende Thrombozyten die zu 2, 3, 4, 5 etc. liegenden Thrombozytenagglutinate gezählt.

---

Das primäre Gerinnsel hat ein Volumen von 10 ccm, den Radius R und die Länge 100 :  $10 = R^2 \cdot 100$ . Das retrahierte Gerinnsel hat zu Zeitpunkt t den Radius r und die Länge a:  $V_t = r^2 \pi \cdot a$ .

Wenn das Verhältnis  $\frac{r}{R} = \frac{a}{100}$  besteht, so ist  $r = \frac{a \cdot R}{100}$

Dann gilt:  $V_t = \frac{a \cdot R}{100} \cdot \pi \cdot a = \frac{a^3 \cdot R^2 \cdot \pi}{10^4}$

Ferner gilt:  $\frac{V_t}{10} = \frac{a^3 \cdot R^2 \cdot \pi}{10^4 \cdot R^2 \cdot 10^2} = \frac{a^3}{10^6}$ ;  $V_t = a^3 \cdot 10^{-5}$

## C. ERGEBNISSE

### I. DAS VERHALTEN VON THROMBOZYTEN UNTER EINWIRKUNG VERSCHIEDENER TEMPERATUREN

#### 1. Versuche bei einer Temperatur von 20-22°C

Wir untersuchen das Blut von 17 normalen Versuchspersonen und konnten - nachdem methodologische Schwierigkeiten beseitigt waren - den prozentualen Anteil am Stadium IV der Evolution (63, 65, 64, 71, 62, 67, 74, 60, 75, 65, 66, 70, 71, 62, 58, 60, 64)<sup>x</sup> bestimmen, den Normalwert mit 60-75 % festlegen und unsere Fehlerbreite mit 3-6 % angeben.

Damit werden die Ergebnisse von H. KREITER und R. ZACH bestätigt.

#### 2. Versuche bei einer Temperatur von 37°C

a) Na citr. 760 mg‰

60 Min.      42 %      50 %      5 %      3 %

Gesamtzahl: 258

b) Na citr. 380 mg‰

41 %      52 %      5 %      2 %

Gesamtzahl: 628

<sup>x</sup>  
n Einzelmessungen

Sind  $x_1, x_2, \dots, x_n$  die einzelnen Werte (allg.  $x_i$ ) dieser Messungen, so ist ihr

$$\text{Mittelwert } \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (1)$$

Zur Beurteilung der Genauigkeit dieser Messungen ermittelt man den mittleren Fehler der Einzelmessungen

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

und daraus den mittleren Fehler des Mittelwertes

$$s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Diff. der Mittelwerte  $D = \bar{x}_1 - \bar{x}_2$

$$s_D = \sqrt{(s_{\bar{x}_1})^2 + (s_{\bar{x}_2})^2}$$

Nach dem t-Test gilt  $t = \frac{D}{s_D}$

t ist einer Tabelle zu entnehmen.

c) Na citr. 190 mg%

|                         |         |                 |      |      |      |
|-------------------------|---------|-----------------|------|------|------|
| Versuchsperson W.A. :   | 60 Min. | 3 %             | 6 %  | 16 % | 74 % |
|                         |         | Gesamtzahl: 443 |      |      |      |
| Versuchsperson H.Kl. :  | 60 Min. | 3 %             | 8 %  | 18 % | 73 % |
|                         |         | Gesamtzahl: 312 |      |      |      |
| Versuchsperson H.J. :   | 60 Min. | 4 %             | 10 % | 18 % | 68 % |
|                         |         | Gesamtzahl: 326 |      |      |      |
| Versuchsperson I.H.J. : | 60 Min. | 5 %             | 15 % | 18 % | 62 % |
|                         |         | Gesamtzahl: 264 |      |      |      |

|                                                                            |         |                 |      |      |      |
|----------------------------------------------------------------------------|---------|-----------------|------|------|------|
| Ein Präparat belassen wir nur 30 Min. im Brutschrank und erhielten folgen- |         |                 |      |      |      |
| des Ergebnis:                                                              | 30 Min. | 3 %             | 13 % | 19 % | 65 % |
|                                                                            |         | Gesamtzahl: 322 |      |      |      |

### Ergebnisse der Versuche a-c

War durch eine geeignete Versuchsanordnung (siehe Methodik) eine Temperaturkonstanz von 37°C gewährleistet, so erhielten wir bei Vorlage der kliniküblichen Citratkonzentration von 3,8 g% (1 ad 5) als gerinnungshemmendes Agens Werte, die sich wesentlich von denjenigen der oben beschriebenen Versuche bei 20°C unterschieden.

Die Evolution war stark gehemmt: Nach 60 Minuten waren höchstens 10 % im Ausbreitungsstadium IV zu beobachten gegenüber 60-75 % bei Versuchen unter 20°C. Überwiegend wurden Plättchen im Stadium II beobachtet, die zart und spindelbäumchenartig verzweigt waren. Ferner ist auffällig, dass die Werte der Evolution nach 30 und 60 Minuten fast identisch sind (also keine Evolution im Sinne einer mehr oder minder raschen Entwicklung der Thrombozyten stattfindet (absolute Hemmung)).

Wir diskutierten zwei Möglichkeiten für die andersartige Evolutionstendenz der Thrombozyten bei 37°C.

- A. unter physiologischen Temperaturbedingungen (37°C) haben die Thrombozyten eine prinzipiell andere Reaktionslage.
- B. Die höhere Temperatur steigert den spezifischen gerinnungs- und damit evolutionshemmenden Na-Citrat-Effekt im Sinne einer erhöhten chemischen Wirksamkeit und schnelleren Ablaufs der chemischen Prozesse.

Entsprechend den unter c angegebenen Ergebnissen sahen wir bei einer Konzentration von 190 mg% Na-citr. eine normale Evolution. Die Ursache liegt also nicht im andersartigen Verhalten der Thrombozyten bei 37°C, sondern in der veränderten chemischen Wirksamkeit des Na-citrat.

### 3. Versuche bei einer Temperatur von 0° bis 40°C

Na-citr. 3,8 g%

|     |      |      |     |
|-----|------|------|-----|
| 2 % | 26 % | 68 % | 4 % |
|-----|------|------|-----|

Gesamtzahl: 373

## Ergebnis

Werden Thrombozyten sofort nach Extravasation niederen Temperaturen (0-4°C) ausgesetzt, so ist ihre Evolution stark gehemmt im Vergleich zu einer Versuchstemperatur von 20°C. Nach 60 Minuten findet sich die Mehrzahl in beginnender Ausbreitung mit dichtem, undurchstrahlbarem Granulomer, während die Endausbreitungsformen nie mehr als 5 % ausmachten. Nach 30 Minuten scheint die Evolution bereits abgeschlossen zu sein.

Wir beobachteten Pseudopodienformen mit langen Ausläufern, die kaum verzweigt waren und eine Ausbreitungsform, die an Spalt- oder Stummelfüße niederer Tiere erinnerte. Wir nennen sie "Kältepseudopodien" (R.MARX).

Es wird angenommen, dass die beobachteten morphologischen Erscheinungen auf eine Hemmung der physiologisch-chemischen Prozesse im Thrombozyten infolge Kälteeinwirkung zurückzuführen sind, da die chemische Aktivität der gerinnungshemmenden Substanz bei niederer Temperatur geringer sein müsste. Diese Annahme fanden wir bestätigt durch das Verhalten von Thrombozyten nach "Kälteschock", wo wir ebenfalls die charakteristischen "Kältepseudopodien" beobachteten.

## II. DAS VERHALTEN DER THROMBOZYTEN UNTER EINWIRKUNG VON ZENTRIFUGIEREN, WASCHEN UND NACH KONTAKT MIT VERSCHIEDENEN OBERFLÄCHEN

### 1. Zentrifugieren

|                |             |     |                 |      |      |
|----------------|-------------|-----|-----------------|------|------|
| 6 Min.         | 1500 U/Min  |     | 21 %            | 19 % | 60 % |
|                |             |     | Gesamtzahl: 362 |      |      |
| 6 Min.         | 2000 U/Min  | 1 % | 12 %            | 30 % | 57 % |
|                |             |     | Gesamtzahl: 251 |      |      |
| 6 Min.         | 3000 U/Min  | 5 % | 16 %            | 20 % | 59 % |
|                |             |     | Gesamtzahl: 145 |      |      |
| 1 Std.         | 3000 U/Min  | 3 % | 13 %            | 19 % | 65 % |
|                |             |     | Gesamtzahl: 246 |      |      |
| 1 Std. 30 Min. | 3000 U/Min  | 2 % | 16 %            | 18 % | 64 % |
|                |             |     | Gesamtzahl: 303 |      |      |
| 4 Min.         | 15000 U/Min | 7 % | 8 %             | 27 % | 58 % |
|                |             |     | Gesamtzahl: 344 |      |      |
| 4 Min.         | 18000 U/Min | 3 % | 8 %             | 21 % | 68 % |
|                |             |     | Gesamtzahl: 313 |      |      |

### Ergebnis

Durch Vermeidung der "thrombozytotoxischen Vitralnoxe" (R.MARX) und durch Aufrechterhaltung einer Temperaturkonstanz von 20°C durch Betätigung der Kühlanlage der Schnellzentrifuge (siehe unter 3) konnten wir den Plättchen

den Reiz hoher Zentrifugierbeschleunigungen zumuten, ohne dass sie in ihrer Funktion beeinträchtigt wurden. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse, die wir in silikonisierten und paraffinierten Zentrifugengläsern erzielten (siehe unten) zeigt, dass die paraffinierte Oberfläche die plättchenschonendste ist.

Bei 18000 U/Min konnten wir im TMG häufiger bizarre Evolutionsformen beobachten: spindelartige Thrombozyten mit sehr langen, meist unverzweigten Pseudopodien an den Polen der Spindel, die möglicherweise als Reaktion der Plättchen auf das Zentrifugieren aufzufassen sind; die normalen Ausbreitungsformen waren durch auffallend verzweigte Pseudopodien gekennzeichnet, die Zahl der Agglutinate erschien leicht gehäuft gegenüber den Ergebnissen unter normalen Versuchsbedingungen.

Alle zentrifugierten Thrombozyten beobachteten wir -ausser im TMG- in den Funktionsprüfungen des TEG und der Retraktion und fanden normale Werte. (Siehe Abb.2). Somit ergibt sich, dass die Thrombozyten Zentrifugierbeschleunigungen bis zu 18000 U/Min ohne registrierbare Funktionseinbusse vertragen, sofern die oben dargestellten plättchenspezifischen Reize ausgeschaltet wurden.

## 2. Waschen

Thrombozytenreiches Citratplasma wird 15 Minuten bei 3000 U/Min zentrifugiert. Das Plasma (jetzt thrombozytenarm) wird abgegossen; die am Boden des Glases sitzenden Thrombozyten werden in 10 ccm NaCl-Lösung (0,9 %ige) aufgenommen und mit einem Holzspatel homogenisiert. Es wird wiederum zentrifugiert und das Verfahren noch zwei Mal wiederholt.

## Ergebnis

Nach dreimaligem Waschen im ursprünglichen Plasma:

|                 |      |      |        |
|-----------------|------|------|--------|
| 6,5 %           | 47 % | 14 % | 31,5 % |
| Gesamtzahl: 260 |      |      |        |

Wir beobachteten, dass dreimaliges Waschen und Zentrifugieren die Thrombozytenfunktion herabmindert und unsere Ergebnisse im TMG, TEG und in der Retraktion eine relative Thrombasthenifizierung der Plättchen zeigten (wobei sich die Retraktionsprüfung als empfindlichster Indikator der Plättchenfunktionsstörung erwies). Daraufhin haben wir uns entschlossen, einen anderen Weg zur Befreiung der Thrombozyten von Plasmabestandteilen einzuschlagen, der -gestützt auf die unter 1 dargelegten Versuchsergebnisse- uns plättchenschonender zu sein schien (siehe unter Methodik).

1 ccm Plasma ad 50-100 ccm NaCl, im Polyäthylenzentrifugenglas bei 16000 U/Min 4 Minuten zentrifugiert, ergab einen Thrombozytenniederschlag, der, den drei Thrombozytenfunktionsprüfungen unterworfen, völlig normale Werte ergab:

TMG        9 %        16 %        11 %        64 %

Gesamtzahl: 288

TEG        m = 120

Retraktion: 82 % (nach BENTHAUS)

### 3. Kontakt mit verschiedenen Oberflächen

TMG nach 1 Stunde 15000 U/Min:

a) Glas            22 %        60 %        8 %        10 %

Gesamtzahl: 226

b) Silikon        15 %        33 %        30 %        22 %

Gesamtzahl: 282

c) Paraffin        5 %        11 %        26 %        58 %

Gesamtzahl: 276

### Ergebnis

Ob ein Verlust der Evolutionspotenz der Thrombozyten bei Glaskontakt durch Plättchenzerfall, Funktionsstörungen durch pH-Änderung (6,9-8,2) oder Adsorption von Inhibitoren bedingt ist, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Rein zahlenmässig erschienen uns die Funktionsverluste der Thrombozyten in nicht silikonisierten Glaswaren nicht so hoch, wie man theoretisch erwarten möchte.

Paraffinierte Oberflächen waren in ihrem plättchenschonenden Effekt den silikonisierten deutlich überlegen. Wir haben alle diese Störungen weitmöglichst auszuschalten versucht, weil offenbar zahlenmässig nicht fassbare Schädigungen für die Erhaltung der Thrombozyten im Konservierungsmedium eine wesentliche Rolle spielen (siehe unten).

## III. VERHALTEN VON TIERISCHEN THROMBOZYTEN

Um unsere in-vitro-V Versuchsergebnisse in vivo überprüfen zu können, z.B. Erhaltung konservierter Thrombozyten im Empfängerorganismus oder Testung klinisch interessanter Pharmaka, haben wir Thrombozyten verschiedener Tiere - vor allem im TMG- bezüglich ihrer Funktionsmorphologie untersucht.

### 1. Kaninchenthrombozyten

Zuerst wird das Verhalten von Kaninchenthrombozyten untersucht, die nicht unter der Einwirkung eines gerinnungshemmenden Agens standen, sogenannte Nativblutthrombozyten. Es wurde ihr Verhalten in verschiedenen Phasen der Gerinnung untersucht, vor allem interessierte dabei im Hinblick auf die Funktionsmorphologie die Evolution der Thrombozyten vor und während des Beginns der Fibrinbildung. Sowohl Nativblutthrombozyten als auch Thrombozyten von Blut mit Zusatz von 760 mg% Na-citr., 380 mg% Na-citr. und 190 mg% Na-citr. als gerinnungshemmende Substanz zeigten Evolutionsstadien IV von

nur 4 % bis 8 %. Die Mehrzahl der Plättchen befand sich in Stadium II und beginnendem Stadium III: die Formen waren von grosser Vielfalt. Oft sahen wir im Bereich eines Pseudopodiums knotenförmige Verdickungen als einzige Ausbreitungszeichen. Das Granulomer war kompakt und undurchstrahlbar und der Plasmasaum dünn, so dass nicht nur bei weitem die intravasale Rundform überwog; sondern die Plättchen auch kleiner als normale menschliche Thrombozyten erschienen. Obgleich wir nach Befreiung der Thrombozyten von Plasmabestandteilen eine Evolution im Stadium IV von 35 % beobachten konnten -also evtl. einen Plasma-Evolutions-Inhibitor annehmen können- scheint doch die Reaktionslage der Kaninchenthrombozyten bezüglich TMG prinzipiell anders zu sein als die der menschlichen Thrombozyten. Im TEG und in der Retraktion fanden wir Werte, die im Bereich der Norm des Verhaltens menschlicher Thrombozyten lagen (siehe Abb.3).

## 2. Meerschweinchenthrombozyten

Durch Herzpunktion mittels V2A-Kanüle Grösse 1 und unter Vorlage von 0,2 Na-citr. 3,8 g% zogen wir in der 2 ccm Record-Spritze Blut bis zur Marke 1 auf.

Wir fanden ein TMG, das im wesentlichen dem der Kaninchenthrombozyten entsprach.

## 3. Rind-, Schaf-, Pferd-, Schweinethrombozyten

Das Blut wurde bei der Schlachtung der Tiere gewonnen, wobei ein Volumenverhältnis Anticoagulans : Blut von 1 : 10 eingehalten wurde.

### Ergebnis

Die Thrombozyten zeigten keine oder nur ganz geringe Evolutionstendenz.

## 4. Huhnthrombozyten

Das Blut wurde durch Punktion einer Flügelvene mittels einer 2 ccm Record-Spritze gewonnen. Als Kanüle wurden V2A-Nadeln Gr.12 verwendet. Citratblut (0,4 : 2) kam zur Untersuchung (siehe Abb.4).

### Ergebnis

Stadium IV 35 %. Es waren öfters keulenförmige Thrombozyten im Stadium II zu beobachten, die dünne, unverzweigte Pseudopodien zeigten. Das Granulomer war kompakt und undurchstrahlbar. Stadium IV machte nie mehr als 35 % aus. Die wenigen völlig ausgebreiteten Formen waren in der Mehrzahl der Fälle sehr weit und völlig rund ausgebildet ("Riesenausbreitungsformen"). Das Granulomer erschien gross, kompakt, scharf abgegrenzt und oft von Vakuolen durchsetzt.

|            |                          |
|------------|--------------------------|
| TEG        | normal, wie menschliches |
| Retraktion | normal, wie menschliche  |

## 5. Hundethrombozyten

(Citratblut aus Hundeversuch in der Chirurgischen Klinik)

-            27 %            29 %            40 %

TEG            normal

Retraktion    normal

Die Adhäsion war normal, während die Evolution leicht gehemmt schien. Auffällig war, dass fast keine Plättchen im Stadium I beobachtet werden konnten und dass Pseudopodienformen fast nicht auftraten. Die Konturen der Rundformen waren meist unscharf, das Granulomer war schollig aufgelockert.

## 6. Rattenthrombozyten

Sofort nach Eintritt des Todes wurde aus der A. carot. Blut entnommen und mit 3,8 %igem Na-citr. ungerinnbar gemacht (1 : 5). Im TMG sahen wir eine geringe Evolutionstendenz der Plättchen. Das Stadium II mit kompaktem, undurchstrahlbarem Granulomer und auffällig schmalem, scharf konturiertem Plasmasaum überwog bei weitem. Die Thrombozyten waren länglich (angedeutete Spindelform) und zeigten relativ lange, wenig verzweigte Pseudopodien. Bei Stadium III war die Ausbreitung oft nur angedeutet in Form von kleinen Knötchen an den Pseudopodien. Echte Ausbreitungsformen im Sinne des Stadiums IV konnten wir nicht beobachten.

## 7. Froschthrombozyten

Die Spindelzellen der Kaltblütler sind das funktionelle Analogon zu den Thrombozyten der Säugetiere, weswegen wir sie in unsere Untersuchungen über morphologische Eigenschaften von Tierthrombozyten mit einbezogen haben.

### A. Methodik

Die Untersuchungen sind am Blut von *Rana esculenta* durchgeführt worden. Zur Blutentnahme bedienten wir uns zweier Methoden:

- a) Nach Dekapitation wird Blut aus dem Ventrikel des Herzens entnommen (0,05 Na-citr. ad 0,5 Blut).
- b) Durch Herzpunktion am lebenden Tier: Mittels einer V2A-Kanüle, Grösse 2 haben wir links vom Sternum den Ventrikel punktiert. Von dem hervorgehenden grossen Blutropfen wird entweder mit einem Glasstab eine kleine Menge entnommen, die zaponierte Neubauer-Zählkammer beschickt und dann entsprechend der Methodik des TMG verfahren, oder bei Vorlage von 0,05 Na-citr. ad 0,5 in einer 1 ccm Record-Glasspritze aufgezogen.

### B. Ergebnisse

Weder Nativblutthrombozyten noch Citratblutthrombozyten zeigten bei der Beobachtung mit dem Phasenkontrastmikroskop Spindelform, auch dann nicht, wenn erst ganz kurze Zeit seit der Blutentnahme vergangen war.

Die Froschthrombozyten sind runde bis ovale, undurchstrahlbare Zellen, die im Lichtmikroskop keine Pseudopodien zeigen - was jedoch deren Vorhandensein nicht unbedingt ausschliesst. Der Kern ist ebenfalls rund (oder leicht oval) und zeigt eine scharfe Randkontur; die Struktur des Protoplasmas ist homogen. Diese morphologischen Merkmale zeigten die Spindelzellen sofort nach Extravasation; sie entsprechen also in lichtmikroskopischer Betrachtung der intravasalen Zirkulationsform. Beobachtet man die Spindelzellen längere Zeit hindurch, so sieht man, dass der Protoplasmasaum eine lebhaftige Umwandlung durchmacht. An seiner Peripherie bilden sich ständig neue Ausstülpungen. Zu Beginn dieser Ausbreitungsvorgänge kann das Granulomer noch dicht und undurchstrahlbar sein. Sind die Spindelzellen weit ausgebreitet -die Zelle ist allmählich grösser geworden- ist eine Differenzierung in Granulomer und Hyalomer deutlich. Der neu entstandene Protoplasmasaum ist ganz zart und durchscheinend. Er hat eine feine Kontur, die glatt begrenzt ist (siehe Abb. 7a).

Die Ausbildung der Fibrinfäden kann von allen Seiten der Zellen ausgehen, aber auch auf einen Zellpol beschränkt bleiben. Länge, Verlauf und Form der Fäden können sehr vielgestaltig sein; meist verlaufen sie schnurgrade. Die Bildung der Fibrinfäden konnten wir nur an den Spindelzellen beobachten, während alle anderen Zellarten des Blutes sie nicht zeigten.

Vielfach liegen die Spindelzellen nicht einzeln sondern in Zellhaufen von 4-10 Zellen, die mit ihrem Protoplasma zu einem Zelleib verschmolzen sind, während die Kerne scharf voneinander getrennt bleiben und ihre Individualität bewahren. Die Veränderungen, die dieser Zellkomplex durchmacht, entspricht dem oben für die Einzelzelle dargestellten.

Gegenüber der Einzelzelle zeigen die Spindelzellagglomerate eine Besonderheit: Die Erythrozyten, die in der Nähe eines Spindelzellkomplexes liegen, werden so beeinflusst, dass sie sich mit ihrer Längsachse auf das Agglomerat als Zentrum einstellen, so dass eine rosettenförmige Anordnung entsteht (Abb. 7b).

### Zusammenfassung

Die morphologischen Veränderungen der Spindelzellen nach Extravasation haben allgemein eine so grosse Ähnlichkeit mit der Funktionsmorphologie menschlicher Thrombozyten, dass sie nicht nur als funktionelle Äquivalente der Plättchen aufzufassen sind, sondern -nach unseren Beobachtungen- als "Testthrombozyten" am besten geeignet erscheinen.

## 8. Die Amöbocyten des Hummers

Aus der Reihe der phylogenetischen Ahnen menschlicher Thrombozyten haben wir die Funktionsmorphologie der Amöbocyten beobachtet:

Durch Punktion des dorsalen Blutgefäßes erhielten wir eine Flüssigkeit, deren Aussehen am ehesten mit xanthochromem Liquor verglichen werden kann und in der zwei Typen von Zellen nachweisbar waren: eine Rundform und eine Spindelform. Diese Zellen zeigen eine Art visköse Metamorphose, die weder mit Na-citrat, Na-oxalat noch mit Sequestren (200 mg%) zu hemmen ist.

#### IV. VERHALTEN VON KONSERVIERTEN THROMBOZYTEN

Nachdem die Thrombozyten von Plasmabestandteilen befreit waren (siehe unter Methodik), haben wir sie in der jeweils immer frisch bereiteten Konservierungslösung suspendiert (durch 5-10 maliges Kippen des Reagenzglases) und sofort in die Kühltruhe gebracht. Eine winzige Probe behielten wir zur Beurteilung im TMG zurück. Waren dem Blut als Anticoagulans Di-Na-Sequestrene zugesetzt worden -bei Konservierung über längere Zeiträume verwandten wir es ausschliesslich- so haben wir in einer Parallelversuchsreihe Citrat-Blutthrombozyten konserviert, um den Einfluss der Konservierung auch im TMG beurteilen zu können.

##### Ergebnisse

TMG (Abb.8)

| Nach 6 Std. Konservierung | 3%              | 8 %        | 21 % | 68 % |
|---------------------------|-----------------|------------|------|------|
|                           | Gesamtzahl: 256 |            |      |      |
|                           | IV              | Gesamtzahl |      |      |
| Nach 12 Stunden           | 71              | 258        |      |      |
| 1 Tag                     | 62              | 225        |      |      |
| 2 Tagen                   | 67              | 326        |      |      |
| 3 Tagen                   | 60              | 264        |      |      |
| 1 Woche                   | 65              | 320        |      |      |
| 2 Wochen                  | 62              | 313        |      |      |
| 3 Wochen                  | 58              | 289        |      |      |
| 4 Wochen                  | 60              | 215        |      |      |
| 6 Wochen                  | 64              | 208        |      |      |
| 8 Wochen                  | 63              | 206        |      |      |
| 10 Wochen                 | 61              | 194        |      |      |
| 12 Wochen                 | 59              | 203        |      |      |

Im TMG sahen wir im Stadium IV für die ganze Versuchsdauer keine Abnahme der Evolutionspotenz bei einer Schwankungsbreite von 51-72 % IV. Diese liegt im Bereich der Norm. Vereinzelt beobachteten wir Riesenausbreitungsformen und bizarre Pseudopodien (z.B. nach 3 Wochen).

Hinsichtlich TEG konnten wir nie eine Abweichung von der Norm beobachten (siehe Abb. 10/11).

Die Retraktion lag nach 6 Wochen ca. 20 % unter der Norm, was ebenfalls in den Bereich physiologischer Schwankungen liegt.

### Zusammenfassung

Unter Beachtung oben genannter Prämissen konnten wir Thrombozyten zentrifugieren, waschen und vor allem über längere Zeiträume konservieren, ohne dass eine Veränderung der Thrombozytenfunktion beobachtet werden konnte. Obgleich die drei Funktionen, die wir prüften, getrennte Qualitäten der Plättchen sind, waren alle drei gleich gut konservierbar. Thrombozytenverluste, die wir beobachteten, gehen zu Lasten der unzureichenden Technik (Konservierungslösung, Waschen der Thrombozyten aus Konservierungslösung). Es war uns möglich, Thrombozyten über längere Zeit funktionstüchtig zu erhalten und die Lebensdauer der Thrombozyten in ACD-Plasmen (siehe R. ZACH) bei weitem zu übertreffen.

## V. THROMBOZYTEN VON THROMBOCYTOPATHISCHEM BLUT

Im folgenden werden Ergebnisse dargestellt, die wir bei Untersuchung verschiedener Lebererkrankungen, Systemerkrankungen und insbesondere bei zwei Fällen von Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli bezüglich der Eigenschaften von Thrombozyten erzielten.

Wir setzten dem Patientenblut als gerinnungshemmendes Agens Na-citr. 60 mg% zu. Es lassen sich also bezüglich TMG nur solche Werte im Sinne eines krankheitsspezifischen Effektes verwerten, die den allein auf die Einwirkung des Citrates zurückzuführenden Effekt übertreffen.

### a) Lebererkrankungen

#### a) Patient Ge.

##### Leberparenchymschaden

6 %      35 %      27 %      21 %

Gesamtzahl: 332

Befund: Die Evolution war sehr stark verzögert, die Plättchen befanden sich in der Mehrzahl im Stad. II. Das Granulomer war kompakt und meist undurchstrahlbar. Die Adhäsion lag im Bereich des Normalen.

#### b) Patient Scho.

##### Leberparenchymschaden

1 %      33 %      10 %      56 %

Gesamtzahl: 243

Befund: Im Gegensatz zu dem oben angeführten Fall lag hier die Ausbreitung an der unteren Grenze der Norm. Auf der Folie klebten zahlreiche Leukocyten.

c) Patient Ba. Anna

posthepatitischer Leberparenchymschaden

15 %      57 %      11 %      17 %

Gesamtzahl: 260

Befund: Bei herabgesetzter Adhäsion war die Evolution sehr stark gehemmt; es zeigten insgesamt nur 28 % der Plättchen Zeichen einer Ausbreitung, wobei die Anzahl der pseudopodientragenden Plättchen vermindert erschien.

d) i) Patient Tr.

ii) Patient Ev. Anton

Zustand nach Verschlussikterus (Cholelithiasis)

i)                  6 %      39 %      37 %      18 %

Gesamtzahl: 270

ii)                3 %      27 %      54 %      16 %

Gesamtzahl: 247

Befund: Bei normalen Leberbefunden (beide Patienten standen vor Entlassung aus stationärer Behandlung) und einem Prothrombinindex von 81 und 66 war die Evolution stark verzögert; die Plättchen befanden sich in der Mehrzahl im Stad. II. Die Adhäsion lag im Normbereich.

e) Patient He.

Hepatitis epidemica

-                  55 %      15 %      30 %

Gesamtzahl: 58

Befund: Die Evolution war deutlich pathologisch, wobei die Mehrzahl der Plättchen Ausbreitungsstadium II zeigten. Auffällig war, dass die Adhäsion besonders stark vermindert war.

f) Patient Se. Ludw.

chronischer Leberschaden

21 %      8 %      18 %      53 %

Gesamtzahl: 47

Befund: Die Evolution war leicht gehemmt, während die Adhäsion sehr stark vermindert erschien. Die Zahl der Plättchen im Stad. I war deutlich vermehrt, wogegen Pseudopodienformen fast nicht auftraten. Die Konturen der Rundformen schienen "ausgefranst" und zeigten einen dunklen Saum.

g) Patient Str. Heinrich

Zustand nach Hepatitis epidemica

3 %      12 %      21 %      64 %

Gesamtzahl: 482

Befund: Bei einem normalen Leberbefund (stand vor Entlassung), Prothrombinindex von 100 und normaler Evolution, war die Adhäsion leicht erhöht.

- h) Patient Ki. Luise  
Cholangitis

7 %      13 %      20 %      60 %

Gesamtzahl: 246

Befund: Bezüglich TMG keine von der Norm abweichenden Befunde.

- i) Patient Ku. Berta  
Lebercirrhose

12 %      5 %      12 %      71 %

Gesamtzahl: 868

Befund: Die Adhäsion war stark erhöht, während die Evolution normale Werte zeigte.

- j) Patient Se. Maria  
Lebercirrhose, Porphyr.cut.tarda

9 %      39 %      17 %      35 %

Gesamtzahl: 103

Befund: Wir fanden pathologische Werte sowohl bezüglich Evolution als auch bezüglich Adhäsion.

- k) Patient Di. Hans  
chronische Hepatitis

4 %      22 %      4 %      70 %

Gesamtzahl: 150

Befund: Obgleich die Evolution normal war, war auffällig, dass das Ausbreitungsstadium III vermindert war und die Anzahl der Plättchen im Stad. II über der Norm lag.

- l) Patient Schre. Ernst  
chronischer Leberschaden

-      13 %      26 %      61 %

Gesamtzahl: 302

Befund: Bezüglich TMG normal, sonst pathologische Leberfunktionsproben.

- m) Patient We. Josef  
chronischer Leberschaden

-      37 %      35 %      28 %

Gesamtzahl: 155

Befund: Die Evolution war deutlich gehemmt, die Plättchen im Stadium III zeigten eine nur geringfügige beginnende Ausbreitung; das Granulomer war meist durchstrahlbar. Die Adhäsion schien vermindert.

- n) Patient Schi. Anna  
Lebercirrhose/Lues

4 %      10 %      3 %      83 %

Gesamtzahl: 31

Befund: Im Gegensatz zu den oben angeführten Fällen war hier die Ausbreitung deutlich beschleunigt, die Zahl der ausgebreiteten Plättchen war um ca. 20 % erhöht gegenüber Normalpersonen. Die Adhäsion war besonders stark vermindert.

o) Chronischer Leberschaden/Cholecystopathie/Gastritis

15 %      57 %      11 %      17 %

Gesamtzahl: 160

Befund: Bei herabgesetzter Adhäsion war die Evolution stark gehemmt. Es zeigten insgesamt nur 18 % der Plättchen Zeichen einer Ausbreitung.

p) Patient Spr. Sebastian

Re-Insuff. /Stauungsleber

9 %      7 %      5 %      79 %

Gesamtzahl: 772

Befund: Die Evolution war leicht beschleunigt, die Adhäsion war besonders stark erhöht, so dass angenommen werden kann, dass die Klebrigkeit der Plättchen erhöht war.

Ergebnis der Versuche a - p

Es wurden 16 Fälle von Lebererkrankungen untersucht, wovon 10 Fälle eine ausgesprochen pathologisches TMG zeigten, 2 Fälle waren bezüglich TMG völlig normal, 1 Fall zeigte bei normaler Evolutionstendenz verminderte Adhäsion, 2 andere normale Evolution und erhöhte Adhäsion, 1 Fall = Grenzfall (zu ähnlichen Ergebnissen kam auch R. ZACH). Somit können wir sagen, dass bei der Mehrzahl der Fälle von Lebererkrankungen bezüglich TMG eindeutig pathologische Befunde erhoben wurden. Welche Bedeutung dem TMG in der Reihe der klinisch leicht handhabbaren Leberfunktionsproben zukommt, bedarf noch eingehender Untersuchungen.

2. Leukämien

a) Patient Wa. Anna

myel. Leukämie

5 %      35 %      20 %      40 %

Gesamtzahl: 260

Befund: Die Evolution war leicht gehemmt, es fanden sich vermehrt Pseudopodienformen. Bei Stad. III war die Ausbreitung oft nur angedeutet in Form von kleinen Knötchen an den Pseudopodien.

b) Patient Ma. Brigitte

Akute Myelose

13 %      44 %      30 %      13 %

Gesamtzahl: 113

Befund: Die Evolution war sehr verzögert, die Plättchen befanden sich in der Mehrzahl im Stad. II. Das Granulomer war kompakt und meist undurchstrahlbar; die Plättchen im Stad. III zeigten eine nur geringfügige beginnende Ausbreitung. Unter den Plättchen fiel eine grosse Anzahl spindelförmiger Formen auf; alle Thrombozyten waren auffällig klein ("Asthen. Thrombozyten bei Myelose"?). Prothrombinindex 39.

c) Patient G. Erna

Myelose

20 %      32 %      20 %      28 %

Gesamtzahl: 103

Befund: Die Evolution war auch in diesem Fall deutlich gehemmt. Die Thrombozyten waren vielfach pseudopodienarm und zeigten meist undurchstrahlbares Granulomer. Prothrombinindex 66. Auffällig waren wieder die asthenischen Formen.

d) Patient Fu. Helga

Leukose

-      22 %      17 %      51 %

Gesamtzahl: 270

Befund: Die Evolution war mässig gehemmt. Das Stad. III zeigte verminderte Ausbreitungstendenz. Die Thrombozytengestalt war meist keulenförmig.

Ergebnisse der Versuche a-d

Bei vier Fällen von Leukämie wurde ein pathologisches TMG gefunden; kleine und z.T. keulenförmige Thrombozyten fielen auf. Ob die "asthenische Thrombozytenform" im TMG ein Charakteristikum leukämischen Patientenblutes ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

3. Lymphogranulomatose

a) Patient Lu. Hildegard

-      38 %      15 %      46 %

Gesamtzahl: 228

Befund: Leichte Evolutionshemmung, sonst normales TMG.

b) Patient Ko. Monutscher

10 %      18 %      23 %      49 %

Gesamtzahl: 248

Befund: Evolution an der unteren Grenze der Norm.

Ergebnisse vorstehender Versuche

Bei Lymphogranulomatose konnten wir kein eindeutig pathologisches TMG darstellen. Damit wurden die Ergebnisse von R. ZACH bestätigt.

#### 4. Osteomyelosklerose

Patient Va. Pauline

9 %      26 %      23 %      42 %

Gesamtzahl: 101

Befund: Bei herabgesetzter Adhäsion war die Evolution leicht gehemmt.

#### 5. Plasmocytom

Patient Ma. Edgar

4 %      21 %      14 %      61 %

Gesamtzahl: 856

Befund: Bei normaler Evolution stark erhöhte Adhäsion, die auf eine Zunahme der Klebrigkeitstendenz der Plättchen schliessen lässt. Die gehäufte Zahl von Thrombozyten-Agglutinaten scheint diese Vermutung zu bestätigen.

#### 6. Thrombocythämien

a) Patient Schö.      Thrombozytenzahl      780.000

b) Patient Fri.      Thrombozytenzahl      920.000

c) Patient Fra.      Thrombozytenzahl      >1 Mill.

Befund: In Anbetracht der ausserordentlich hohen Zahl von Thrombozyten waren Auszählung und Differenzierung so erschwert, dass wir eine Plasmaverdünnung (1 : 10) mit NaCl phys. wählten und dann die Kammern beschickten. Hier konnten wir im Stad. IV 51 % 57 % 62 % Thrombozyten beobachten, wobei die Evolution deutlich beschleunigt war.

#### 7. Makroglobulinämie Waldenström

a) Patient Wü. Elisabeth

6 %      20 %      14 %      60 %

Gesamtzahl: 393

Befund: Normales TMG.

b) Patient Go. Anna

7 %      57 %      3 %      33 %

Gesamtzahl: 54

Befund: Bei geringer Adhäsion war die Evolution deutlich gehemmt.

c) Patient N.

10 %      33 %      25 %      32 %

Gesamtzahl: 197

Befund: Die Evolution war stark gehemmt, während die Adhäsion normal war.

d) Patient Mo. Fr.

|                 |      |      |      |
|-----------------|------|------|------|
| -               | 18 % | 21 % | 61 % |
| Gesamtzahl: 240 |      |      |      |

Befund: Die Evolutionstendenz lag im Bereich der Norm; die Thrombozyten waren in der Mehrzahl besonders weit und völlig rund ausgebreitet. Sie waren wesentlich grösser als normale Thrombozyten. Das Granulomer erschien gross und kompakt. Neben diesen "Riesenausbreitungsformen" beobachteten wir nur vereinzelt normale Thrombozyten, während wir in Normalpräparaten diese "Riesenformen" nur zu etwa 2-5 % sahen.

## Ergebnis

Dass alle Fälle von Makroglobulinämie Waldenström ein pathologisches TMG zeigen (R. ZACH), konnten wir nicht bestätigen. In zwei Fällen fanden wir ein normales TMG, wobei in einem Fall Riesenausbreitungsformen auftraten. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Ausbreitungstendenz der Thrombozyten abhängig ist von der Struktur der Pathoproteine, die wahrscheinlich bei den verschiedenen Makroglobulinämien Waldenström verschieden ist. Diese These bedarf jedoch noch eingehender Untersuchungen.

## 8. Afibrinogenämien

a) Afibrinogenämie post partum

|     |     |      |      |
|-----|-----|------|------|
| 1 % | 6 % | 21 % | 72 % |
|-----|-----|------|------|

Befund: Normales TMG.

b) Patient Zwe. Fr.

erworbene Afibrinogenämie

|     |      |      |             |
|-----|------|------|-------------|
| 8 % | 44 % | 34 % | <u>14 %</u> |
|-----|------|------|-------------|

Gesamtzahl: 598

Befund: Auffallend war hier die hohe Zahl haftender Thrombozyten. Die Evolution war stark gehemmt, die Thrombozyten waren relativ klein.

zu b) Patient Zwe.

10 Min. post Inf. Fibrinog.:

|     |      |      |      |
|-----|------|------|------|
| 8 % | 57 % | 25 % | 10 % |
|-----|------|------|------|

Gesamtzahl: 440

18 Std. post Infusionem:

|     |      |      |      |
|-----|------|------|------|
| 8 % | 40 % | 20 % | 32 % |
|-----|------|------|------|

Befund: Eine Verbesserung der Evolutionstendenz durch Fibrinogeninfusion konnte erreicht werden, jedoch lag die Zahl der ausgebreiteten Plättchen noch unter der Norm, während die Adhäsion leicht erhöht war.

## 9. Polycythämia vera

### a) Patient Hu. Walburga

|      |      |      |      |
|------|------|------|------|
| 12 % | 25 % | 23 % | 40 % |
|------|------|------|------|

Gesamtzahl: 303

### b) Patient Schi. Max

|     |      |      |      |
|-----|------|------|------|
| 8 % | 34 % | 17 % | 41 % |
|-----|------|------|------|

Gesamtzahl: 328

## Ergebnis zu a und b

Bei mässig gehemmter Evolution und normaler Adhäsion beobachteten wir gehäuft Agglutinate. Die Plättchen zeigten besonders bizarre Ausbreitungsformen, wobei hantelförmige überwogen. Die Pseudopodien waren meist zahlreich und stark verzweigt.

## 10. Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli

### a) Patient Le. Ilse

|      |      |      |     |
|------|------|------|-----|
| 23 % | 44 % | 24 % | 4 % |
|------|------|------|-----|

Gesamtzahl: 90

Befund: Die Adhäsion war vermindert, die Evolution stark gehemmt. Bei Stad. II sind die Pseudopodien kurz, oft stummelartig. Bei kompaktem Granulomer zeigten die Plättchen unscharfe, unregelmässig eingefranste Konturen.

### b) Patient Le. Hildegard (Schwester)

|      |      |      |     |
|------|------|------|-----|
| 25 % | 50 % | 17 % | 8 % |
|------|------|------|-----|

Gesamtzahl: 120

Befund: Auch hier war das TMG stark pathologisch. Bei Stad. III zeigte sich nur geringe Ausbreitungstendenz. Sonst ergab sich etwa das gleiche Bild wie bei a.

Zur Klärung der Fragen, inwieweit die Evolution abhängig ist

1. vom Plasmamilieu,

2. von Spuren von Plasma, die nach unserer Methode der Befreiung von Plasmabestandteilen noch an den Thrombozyten haften und

3. vom Elektrolyt- und Zuckermilieu,

haben wir folgende Versuche durchgeführt:

### aa) Plasmaverdünnung mit 0,9 %iger NaCl-Lösung

Plasma: NaCl (0,9 %iger) 1 : 6

|     |      |      |      |
|-----|------|------|------|
| 8 % | 52 % | 26 % | 14 % |
|-----|------|------|------|

Gesamtzahl: 95

Plasma: NaCl (0,9 %iger) 1 : 10

|     |      |      |      |
|-----|------|------|------|
| 3 % | 54 % | 27 % | 16 % |
|-----|------|------|------|

Gesamtzahl: 103

bb) Waschen

1 ccm Plasma ad 50 ccm NaCl

Bei 16000 U/Min 4 Minuten zentrifugiert. Thrombozytenniederschlag in 0,5 NaCl aufgeschwemmt und dann Kammer beschickt.

6 %      42 %      - 35 %      18 %

Gesamtzahl: 87

cc) Evolution im eigenen Plasma

Nachdem wir durch zweimaliges Zentrifugieren bei 16000 U/Min 4 Minuten thrombozytenfreies Plasma hergestellt hatten, haben wir den Thrombozytenniederschlag einmal im eigenen Plasma und einmal in NaCl aufgeschüttelt und im TMG folgende Werte gefunden:

i) im eigenen Plasma

12 %      53 %      26 %      9 %

Gesamtzahl: 77

ii) in NaCl (0,9 %)

24 %      37 %      20 %      19 %

Gesamtzahl: 112

Ergebnisse der Versuche aa) bis cc)

Durch Verdünnung des Plasmamilieus und weitgehende Befreiung von Plasmapbestandteilen ergab sich eine Plättchenevolution, die 20-25 % gegenüber dem Ausgangswert erhöht war. Die Evolution war noch immer sehr gehemmt, jedoch wurde eine grössere Zahl Thrombozyten im Stad. III gefunden. Danach müssen wir annehmen, dass bei der Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli ein qualitativ pathologisches Verhalten der Thrombozyten vorliegt, wobei ein Plasma-Evolutions-Inhibitor noch einen zusätzlichen Hemmeffekt zu bewirken scheint.

In einer weiteren Versuchsreihe haben wir die Wirkung von Laevadosin und seiner verschiedenen Bestandteile in ihrer Wirkung auf Thrombasthenische Thrombozyten im TMG, TEG und in der Retraktion eingehend untersucht. Bei einer Konzentration von 6,6 mg% in vitro und 0,31 mg% in vivo (Max. Min. Dosis 0,2 mg%) konnten wir eine Funktionssteigerung der Thrombozyten beobachten, die am grössten unter dem Einfluss energiereicher Phosphate -insbesondere von ATP- war.

Die Originalpräparate (Fa. Böhringer, Mannheim) haben wir -nach den Beobachtungen verschiedener Verdünnungsreihen- immer 1 : 10 mit NaCl (phys.) verdünnt.

Patientin Le. Ilse

TMG      8 %      25 %      , 33 %      34 %

Gesamtzahl: 486

Bei -gegenüber dem Normalblut- erhöhter Adhäsion fanden wir insgesamt 67 % der Plättchen in Ausbreitung begriffen, während ohne Pharmaka Ausbreitungsformen bis höchstens 28 % gefunden wurden.

## TEG (siehe Abb. 13)

Das Thrombelastogramm weist eine anhaltende Verschmälerung auf, die durch Zugabe von Laevadosin bzw. energiereicher Phosphaten (1 : 5 oder 1 : 10 verdünnt) weitgehend normalisiert werden kann.

### Retraktion

Mit der Methode von BENTHAUS fanden wir Retraktionswerte, die nie über 10 % lagen. Nach Zugabe von Laevadosin bzw. ATP erhielten wir Werte zwischen 35 und 50 %. Das in seinem Kern relativ gut retrahierte Plasma-gerinnsel war nicht -wie sonst üblich- glattrandig, sondern an seiner Oberfläche stark aufgefasert und mit dünnen Fibrinschleiern überzogen (siehe Abb. 16). Die Verbesserung der Retraktion bezog sich fast ausschliesslich auf die Längsretraktion, während sich das Gerinnsel quer nicht so deutlich besser retrahierte. (Zwei Stoffe für Retraktion?)

### Therapie

Wir injizierten bei den Patienten Le. Ilse und Le. Hildegard Laevadosin (3,1 ccm in 25 Minuten bzw. 4,1 ccm in 20 Minuten - geringe Tachycardie). Bei Thrombozytenzahlen von 174.000 bzw. 184.000 erhielten wir bezüglich der Thrombozytenfunktionsprüfungen folgende Werte:

#### Patientin Le. Ilse

|                      | <u>vor Injektion</u>        |        | <u>nach Injektion</u> |      |
|----------------------|-----------------------------|--------|-----------------------|------|
| TMG                  | IV                          | 7 %    | IV                    | 35 % |
| Retraktion n. 2 Std. | 52 mm                       |        | 26 mm                 |      |
| (nach Benthau)       | Gerinnsellänge              |        |                       |      |
|                      | Breite unverändert          |        |                       |      |
|                      | keine Besserung!            |        |                       |      |
|                      | Fibrinolyse + !             |        |                       |      |
| TEG                  | r                           | 8°     | 8'                    |      |
|                      | k <sub>1</sub>              | 9 1/2' | 9'                    |      |
|                      | m                           | 75     | 61                    |      |
|                      | Bis 40' keine Fibrinolyse.  |        |                       |      |
| Adhäsion             |                             |        |                       |      |
| (n. R. MARX)         | 20 %                        |        | 25 %                  |      |
| Blutungszeit         | 25', unbeeinflussbar        |        |                       |      |
|                      | durch Laevadosin-Injektion. |        |                       |      |

#### Patientin Le. Hildegard

|                      | <u>vor Injektion</u> |      | <u>nach Injektion</u> |      |
|----------------------|----------------------|------|-----------------------|------|
| TMG                  | IV                   | 13 % | IV                    | 38 % |
| Retraktion n. 2 Std. | 56 mm                |      | 30 mm                 |      |
|                      | Gerinnsellänge       |      |                       |      |

|              | vor Injektion               | nach Injektion |
|--------------|-----------------------------|----------------|
|              | Keine Differenz             |                |
|              | der Fibrinolyse, noch       |                |
|              | kleiner Rest bei beiden.    |                |
| TEG          | 15                          | 13             |
|              | 15                          | 12             |
|              | 39 40                       | 52 40          |
| Adhäsion     | 20 ‰                        | 29 ‰           |
| Blutungszeit | 20', unbeeinflussbar        |                |
|              | durch Laevadosin-Injektion. |                |

Agglutinogramm (siehe unter Methodik)

Die Patientinnen zeigten folgendes Agglutinogramm:

|             |                                        |
|-------------|----------------------------------------|
| Pat. Le.H.  | K : 100 : 1                            |
|             | C : 100 : -    vereinzelt Riesenformen |
| Pat. Le. I. | K : 100 : 3 : 1                        |
|             | C : 100 : -                            |

Nach i. v. Injektion von 4 ccm Laevadosin (= 0,8 mg%) in 9 Min. bei der Patientin Le.H. und in 11'40" bei der Patientin Le.I. beobachteten wir folgendes Agglutinogramm:

|            |                          |
|------------|--------------------------|
| Pat. Le.H. | K : 100 : 12 : 4 : 2 : 3 |
|            | C : 100 : 11 : 3 : 1 : 1 |
| Pat. Le.I. | K : 100 : 11 : 9 : 5 : 6 |
|            | C : 100 : 11 : 3 : 1 : 1 |

## Ergebnis

Nach langsamer i. v. Injektion von Laevadosin konnten wir in den verschiedenen Tz-funktionsprüfungen eine gewisse bis deutliche Leistungssteigerung der pathologischen Thrombozyten beobachten.

Wegen der starken Kreislaufwirkungen und des raschen Abbaus von ATP-Präparaten, ist es noch nicht möglich, einen therapeutisch optimalen ATP-Spiegel im Blut aufrechtzuerhalten. Als i. v. Injektion (kurzfristig) oder eventuell -soweit eine (genügende) Resorption erfolgt- als Buccaltabletten (langfristig) appliziert, vermag Laevadosin die Blutungsbereitschaft aber allenfalls doch günstig zu beeinflussen, so dass uns die z. Zt. beste Therapieform bei bedrohlichen Blutungen in Fällen von Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli in der Kombination von Ersatz der pathologischen Plättchen durch normale und i. v. Tropfinfusion von Laevadosin zu sein scheint.

## Zusammenfassung

Bei zwei Fällen von Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli konnten wir durch Zusatz von Laevadosin bzw. energiereichen Phosphaten eine Funktionssteigerung der qualitativ pathologischen Thrombozyten erzielen (50-55 %). Eine echte Normalisierung der Thrombozytenfunktion konnte in keinem Test gefunden werden. Ob die Pharmaka einen Entlastungsreiz oder eine Energiesubstitution bewirken, konnte mit der angewandten Methodik nicht entschieden werden.

## DISKUSSION

Anhand von 16 Fällen von Leberaffektionen konnten wir in zwei Dritteln der Fälle ein eindeutig pathologisches TMG demonstrieren und messen dem TMG als Leberfunktionsprüfung eine -noch genauer zu bestimmende- Bedeutung zu. Ein pathologisches TMG wurde in all den Fällen gesehen, wo es sich um schwere Beeinträchtigung des Knochenmarks handelt. Bei Lymphogranulomatose fanden wir auch unter dem Einfluss der Zytostatica-Therapie kein ausgesprochen pathologisches TMG (vergl. R. ZACH).

Eine interessante Gruppe stellt in diesem Zusammenhang die Makroglobulinämie Waldenström dar. Wir fanden teils ein pathologisches TMG (2 Fälle), teils ein normales TMG (2 Fälle) und nehmen an, dass die Evolutionstendenz von der jeweiligen Struktur der Pathoproteine abhängig ist.

In zwei Fällen von Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli konnten wir ein stark pathologisches TMG darstellen und fanden somit die Ergebnisse von G. KÖPPEL, K. KÖHL, H. KREITER, H. J. IBROM und R. ZACH bestätigt. Mittels vierer Thrombozytenfunktionsprüfungen (TMG, TEG, Retraktion, Adhäsion) konnten wir zeigen, dass die Ursache der fehlenden Evolutionstendenz in einem qualitativ pathologischen Verhalten der Thrombozyten liegt, wobei die Bedeutung eines hypothetischen Plasmaevolutionsinhibitors nicht so gross ist, wie wir aufgrund theoretischer Überlegungen meinten.

Durch Zusatz energiereicher Phosphate (Laevadosin, ATP u. a.) konnten wir ein in vitro deutliche Leistungssteigerung der pathologischen Plättchen erzielen. Diese Ergebnisse wurden in vivo nach i. v. Injektion von Laevadosin bestätigt. Ob es sich dabei um einen Entlastungsreiz oder ein Energiesubstitutionsphänomen handelt, war mit unserer Methode nicht zu entscheiden.

Die restlichen 9 Fälle sind Einzelbeobachtungen und als solche zu werten.

## SCHLUSSWORT

Die gestellte Aufgabe, die Voraussetzungen der Thrombozytenkonservierung in gefrorenem Zustand zu prüfen, scheint uns in vorliegender Form weitgehend gelöst.

Mit Hilfe der ausgearbeiteten Methode konnten in einem Medium (nach R. MARX) Thrombozyten bis zu 12 Wochen funktionstüchtig erhalten werden. Bei der Beurteilung der konservierten Thrombozyten wurde deutlich, dass die Eigenschaften, die wir im TMG, TEG und in der Retraktion prüften, von einander unabhängige Qualitäten der Thrombozyten darstellen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Evolution (in Anwesenheit eines Anticoagulans) weitgehend von der Temperatur abhängig ist.

Das TMG wurde weiterhin bei thrombocytophathischem Blut dargestellt. Es zeigten sich zum Teil beachtliche Abweichungen von der Reaktionsnorm. Bei zwei Fällen von Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli konnte durch Pharmaka eine Teilnormalisierung der Thrombozytenfunktion erzielt werden. Wir meinen, dass es mit Hilfe der drei verschiedenen Thrombozytenfunktionsproben möglich sein kann, therapeutische Versuche bei Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli zu überprüfen.

## ZUR CHEMIE DES LAEVADOSIN

### Zusammensetzung:

Laevadosin (Ampullen zu 10 ccm) ist ein "Muskel-Coferment-Gemisch" in gepufferter, stabilisierter Lösung. In 1 ccm sind folgende Nukleoside und Nukleotide enthalten:

|                   |      |                      |        |
|-------------------|------|----------------------|--------|
| Adenosinphosphate | 5 mg | Guanosinmonophosphat | 1,5 mg |
| Adenosin          | 5 mg | Guanosin             | 1 mg   |
| Inosin            | 5 mg | Uridin               | 1 mg   |

Die Nucleoproteide sind mit dem 1890 von MIESCHER entdeckten Nuklein identisch. Diese Substanzen haben bis heute immer grösseres Interesse gewonnen, weil sie im lebenden Organismus an den wesentlichsten chemischen Funktionen der Zelle entscheidenden Anteil haben. Es hat sich gezeigt, dass die Nucleinkörper in allen lebenden Zellen aufgefunden werden können und dass ihre Bausteine grundsätzlich dieselben sind.

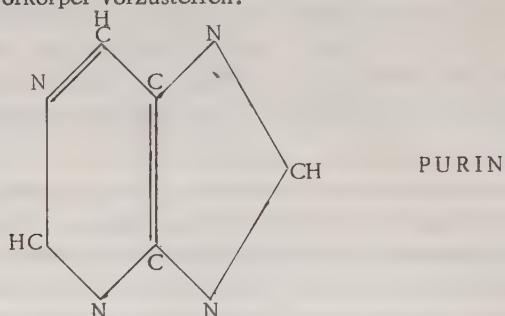
Durch vorsichtige Hydrolyse isolierter Nucleoproteide gelingt es, vier Bestandteile voneinander zu trennen:

- durch Abspaltung eines Eiweissmoleküls bildet sich das Nucleitid, auch Nucleinsäure genannt. Dieses besteht aus
- einem Molekül Phosphorsäure,

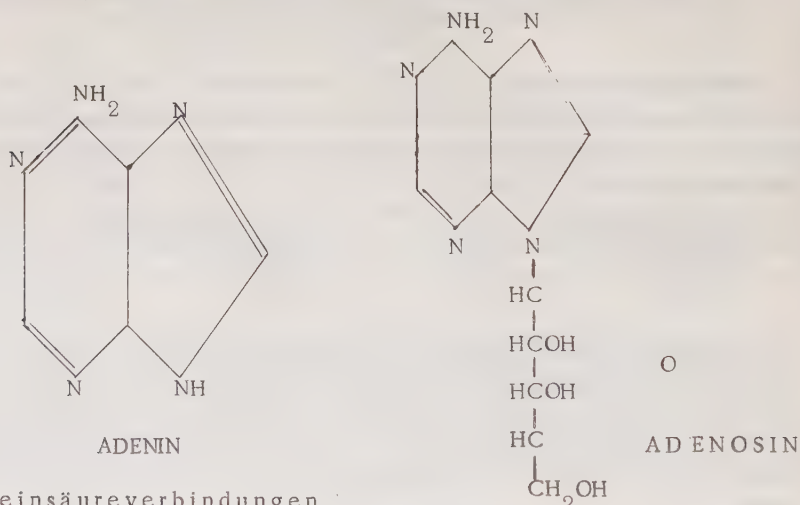
- c) einem Molekül Ribose und
- d) einer Purin- bzw. Pyrimidinbase.

Die Verbindung von Purin- bzw. Pyrimidinkörper und Ribose nennt man ein Nukleosid. Die Verbindung einer Nukleinsäure mit einem Eiweissanteil bezeichnet man als Nucleoprotein.

1. Purine hat man sich nach E. FISCHER als Kondensationsprodukt eines Pyrimidins mit einem Amidazolkörper vorzustellen.



Die physiologisch wichtigsten Purinderivate sind Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Harnsäure, wobei dem Adenin besondere Bedeutung im Adenylsystem bei der Gewinnung und Übertragung biologisch wirksamer Energie zukommt.



## 2. Nukleinsäureverbindungen

Nukleinkörper können im Organismus als Mononukleotide, Di- und hochpolymere Polynukleotide auftreten. Sie entfalten ihre physiologische Funktion stets in einer Verbindung mit einem Eiweiss als Nucleoproteide. Die im Laevadosin enthaltenen Mononucleotide spielen als Cofermente bei einer Reihe enzymatischer Umsetzungen eine entscheidende Rolle. Die Adenylsäure ist die Schlüsselsubstanz für die Speicherung und Übertragung biologischer Energie. Adenin

trägt in Stellung 9 die Ribose, an den 5-C-Atom ein bis drei Phosphorsäurere-  
ste in energiereicher Bindung angelagert werden können. Auf diese Weise bil-  
det sich aus Adenosinmonophosphat (AMP) über Adenosin-diphosphorsäure (ADP)  
die Adenosin-tri-phosphorsäure (ATP). Bei der Spaltung der Pyrophosphatbin-  
dungen aus ATP und ADP werden jeweils 1100 cal/Mol biologisch verwertbarer  
Energie freigesetzt die bei Synthesen und anderen energieverbrauchenden Pro-  
zessen der Zelle Verwendung finden kann. Alle intermediären Umsetzungen  
der Zelle, die Energie verbrauchen, sind an das Vorliegen von energiereichem  
Phosphor in Form der Adenylsäure-Phosphorverbindungen gebunden. Das Ziel  
des hydrolytischen und oxydativen Abbaues biologisch verwertbarer Substanzen  
in der Zelle ist es, Energie durch Anlagerung von Phosphorsäure an die Adenyl-  
säure zu speichern. Durch Anlagerung und Abspaltung der letzten Phosphorsäu-  
regruppen gehen energetische Auf- und Entladungen in der Zelle vor sich. Über  
den genauen chemischen Vorgang, der zu dieser Bindung führt, ist bis heute  
noch nichts bekannt, besonders nicht über das Wesen des Kopplungsmechanis-  
mus zwischen Phosphorverbindung und Stoffwechselumsatz.

#### Anmerkung:

Die Präparate der Firma Eöhringer, Mannheim -Lösungen und Trockensub-  
stanzen- haben wir im Kühlschrank (4°C) verwahrt, bei Versuchsbeginn entnom-  
men und die erforderlichen Lösungen bzw. Verdünnungsreihen mit NaCl (phys.)  
hergestellt und sofort dem Testplasma zugesetzt.

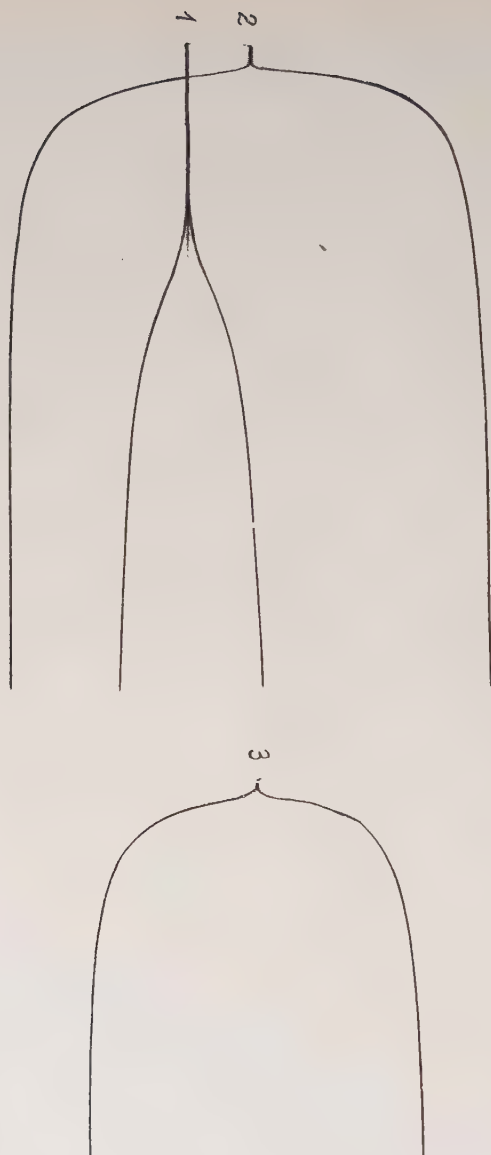


ABBILDUNG 2

- 1 = thrombozytenfreies Plasma
- 2 = TEG nach 8 Min., 16000 U/Min
- 3 = TEG nach 6 Wochen Thrombozytenkonservierung

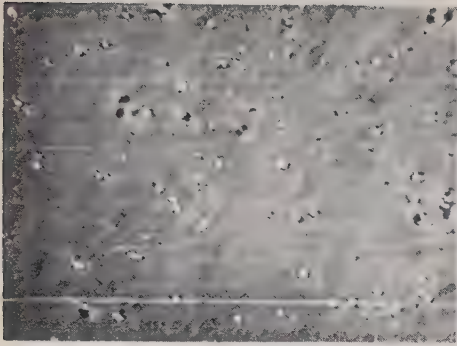


ABBILDUNG 3

Thrombozytenevolution Kaninchen



ABBILDUNG 4

Thrombozytenevolution Huhn



ABBILDUNG 7a

ABBILDUNG 7b

Spindelzellen des Frosches

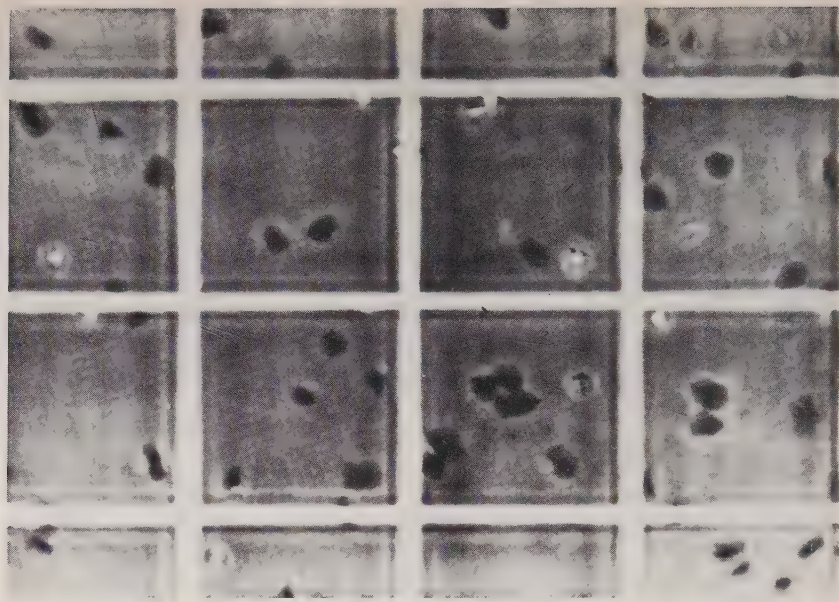


ABBILDUNG 6

Thrombozytenevolution nach 120 Tagen Konservierung

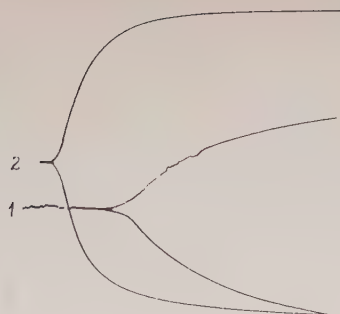


ABBILDUNG 9

- 1 = TEG Huhn (Citratplasma recalcifiziert)  
 2 = TEG Kaninchen (Citratplasma recalcifiziert)

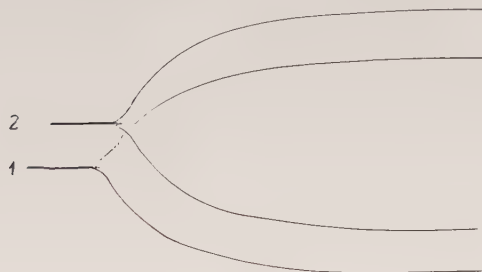


ABBILDUNG 10

- 1 = TEG nach 12 Wochen Thrombozytenkonservierung  
 2 = thrombozytenfreies Plasma  
 3 = thrombozytenfreies Plasma

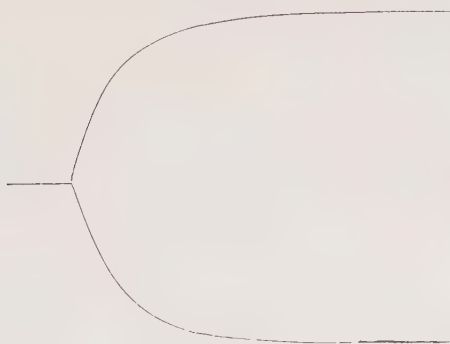


ABBILDUNG 11

TEG nach 20 Tagen Thrombozytenkonservierung

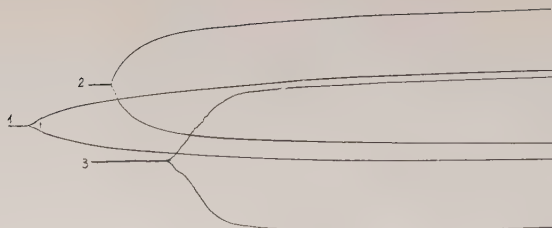


ABBILDUNG 13

TEG: Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli

1 = Plasma ohne Zusatz

2 = Plasma + ATP (1 : 10) = 6,25 mg%

3 = Plasma + ATP (1 : 5) = 12,5 mg%



ABILDUNG 14

TEG: Thrombasthenie Glanzmann Naegeli  
(Pat. Le. Ilse)

1 = Plasma + ATP (1 : 5) = 12,5 mg%

2 = Plasma ohne Zusatz

3 = Plasma + Laevadosin (1 : 10)

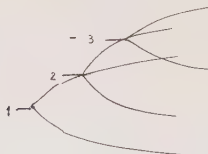


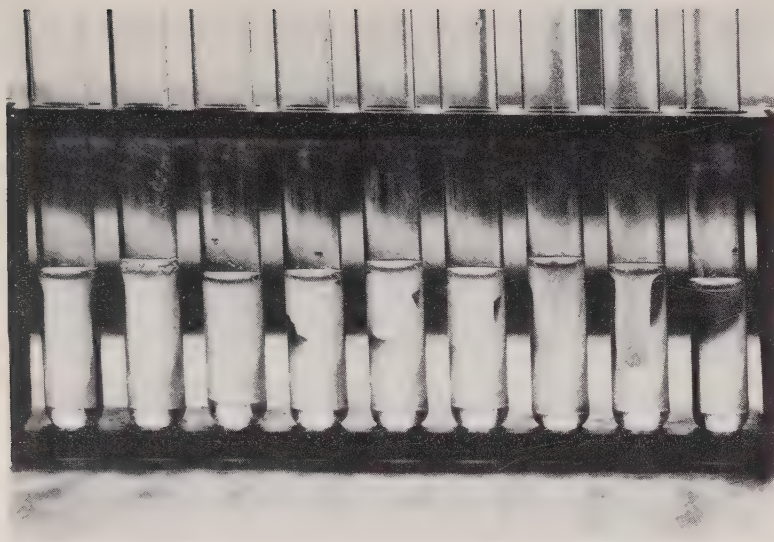
ABBILDUNG 15

TEG: Thrombasthenie Glanzmann Naegeli  
(Pat. Le. Ilse)

1 = Plasma + ATP (1 : 10)

2 = Plasma + Adenosin

3 = Plasma + Inosin



# ABBILDUNG 16

Retraktion (nach 6 Stunden)

Patientin Le. Ilse

Von links nach rechts:

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| Patientenplasma (ohne Pharmakon) | 3,5 cm l |
| Leerlösung                       | 3,2 cm l |
| Laevadosin                       | 2,8 cm l |
| Guanosin                         | 2 5 cm l |
| Inosin                           | 2,8 cm l |
| Adenosin                         | 2,8 cm l |
| ATP (1 : 10) = 6,25 mg%          | 2,0 cm l |
| ATP (1 : 5) =12,5 mg%            | 1,5 cm l |

Retraktion einer normalen Versuchsperson

Bei gleicher Versuchsanordnung erhielten wir bei Patientin Le. Hildegard (Schwester) folgende Werte in der Retraktion:

| Nach 8 Stunden             | <u>Länge</u> | <u>Breite</u> |
|----------------------------|--------------|---------------|
| 1. Patientenplasma         | 2,3 cm       | 1,9 cm        |
| 2. Leerlösung              | 2,8 cm       | 1,15 cm       |
| 3. ATP (1 : 10)            | 2,4 cm       | 1,1 cm        |
| 4. ATP (1 : 20) = 3,13 mg% | 1,8 cm       | 0,9 cm        |
| 5. ATP (pulv.)             | 2,0 cm       | 1,0 cm        |
| 6. ATP (1 : 5)             | 1,9 cm       | 0,85 cm       |

Nach 22 Stunden zeigten 1, 3, 4 totale Fibrinolyse, 2, 5 etwas Fibrinolyse, während 6 keine Fibrinolyse aufwies. Dies legt die Vermutung nahe, dass hohe ATP-Konzentration die Fibrinolyse im Serum hemmen. Diese These bedarf noch experimenteller Bestätigung.

Herrn Prof. Dr. H. SCHWIEGK danke ich für die Übernahme des Correferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. MARX, der mir das Thema zu vorliegender Arbeit stellte, mir einen Laborplatz überliess und mich im Verlauf der Experimente jederzeit freundlich mit Rat und Tat unterstützte.

# LITERATURVERZEICHNIS

- BENTHAUS, J.      Über die Retraktion des Blutgerinnsels (Thrombosis et Diathesis haemorrhagica, vol.III 1958, Friedr.Karl Schattauer Verlag, Stuttgart)
- GROSS, R.          Aktuelle Probleme des Thrombozytenersatzes (Bibl.haemat. vol.9, pp 92-102, Karger, Basel/New York, 1959)
- GROSS, R., GEROK, W., LÖHR, G.W., VOGELL, W., WALLER, H.D. und THEOPOLD, W.      Über die Natur der Thrombasthenie. Thrombopathie Glanzmann-Naegeli. (Klin. Wochenschrift, 38.Jahrgang, Heft 5, 1.März 1960, S.193 ff. Springer-Verlag, Heidelberg)
- JÜRGENS, J. und BELLER, F.K.      Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1959)
- LÖHR, G.W., WALLER, H.D., KARGES, O., SCHLEGEL, B. und MÜLLER, A.A.      Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrocyten (Klin. Wochenschrift, 36.Jahrgang, 21.Heft, 1.November 1958, S.1008-1013, Springer-Verlag, Heidelberg)
- KÖHL, K.H.        Über die Funktionsmorphologie normaler menschlicher Thrombozyten unter dem Einfluss von Pharmaka (Dissertation, München 1955)
- KREITER, H.        Das Thrombozyten-Metamorphogramm. Evolution und Adhäsion von Thrombozyten unter Einwirkung gerinnungshemmender Substanzen sowie bei hämorrhagischen Diathesen (Dissertation, München 1958)
- MARX, R. und DERLATH, S.      Über eine Methode zur vergleichend quantitativen Bestimmung der Thrombozytenadhäsivität an blutfremden Oberflächen, unter gleichzeitiger Erfassung der relativen Blutviskosität (Zeitschrift "Blut", Band III, F.J.Lehmanns Verlag, München)
- SCHWEIGHART      Studien über Thrombozytenagglutination und Thrombozytenagglutinationstendenz (Dissertation, München 1957)
- SLOVITER, H. A.    Fortschritte auf dem Gebiet der Erythrocytenkonservierung (Klinische Wochenschrift, 29.4.57 Springer-Verlag, Heidelberg)
- TULLIS, SURGENOR and BANDEURA      Preserved Platelets; Preparation, storage and clinical use (Zeitschrift "Blood", vol.XIV, No.4, April 1959)

TULLIS, J.L. and associates

Clinical Use of Frozen Red Cells (A.M. A. Archives of Surgery, July 1960, vol.81, pp. 151-154 Copyright 1960, by American Medical Association)

WEISS, G. und HABRICH, F.J.

Die Spindelzellen des Froschblutes und ihre Beteiligung an der Gerinnung. Beobachtungen im Phasenkontrastmikroskop (Zeitschrift "Blut" Band V, F.J. Lehmanns Verlag, München)

ZACH, R.

Das Thrombozyten-Metamorphogramm bei thrombozytopathischem Blut unter besonderer Berücksichtigung der Thrombopenien und bei konserviertem Normalblut (Dissertation, München 1960)

## LEBENS LAUF

Am 18. Januar 1935 wurde ich als Sohn des Feinmechanikers Ludwig Appel und dessen Ehefrau Hermine, geb. Stork, in Kaiserslautern geboren. Nach vierjähriger Volksschulzeit in der Dorfschule Mackenbach/Pfalz besuchte ich das Naturwissenschaftliche Gymnasium Kaiserslautern, wo ich im Frühjahr 1955 das Abitur ablegte. Während dieser Zeit lebte ich in der Familie von Prof. Fischer der sich auch meine Erziehung angelegen sein liess. Nach einjährigem Studium am Leibniz-Kolleg der Universität Tübingen begann ich das Medizinstudium und beendete im Juli 1958 mit bestandenem Physikum an der Universität Tübingen die vorklinische Studienzeit. Seit Wintersemester 58/59 studiere ich in München und habe von September 1959 bis Dezember 1960 den experimentellen Teil vorliegender Arbeit ausgeführt. Am 17. April 1962 habe ich das Staatsexamen bestanden.







